

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 5 月 19 日 (19.05.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/100716 A1

(51) 国际专利分类号:
C09B 23/02 (2006.01) *C07D 413/06* (2006.01)
C07D 417/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/130477

(22) 国际申请日: 2021 年 11 月 12 日 (12.11.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
PCT/CN2020/128838
2020 年 11 月 13 日 (13.11.2020) CN

(71) 申请人: 大连理工大学 (DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。深圳迈瑞生物医疗电子股份

有限公司 (SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦, Guangdong 518057 (CN)。

(72) 发明人: 樊江莉 (FAN, Jiangli); 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。陈庚文 (CHEN, Gengwen); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦, Guangdong 518057 (CN)。夏天平 (XIA, Tianping); 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。叶焱 (YE, Yi); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦, Guangdong 518057 (CN)。张子千 (ZHANG, Ziqian); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦, Guangdong 518057 (CN)。姚起

(54) Title: CYANINE COMPOUND, DYE CONTAINING CYANINE COMPOUND, AND USE OF CYANINE COMPOUND

(54) 发明名称: 菁类化合物、含菁类化合物的染料以及菁类化合物的应用

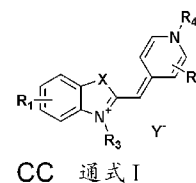
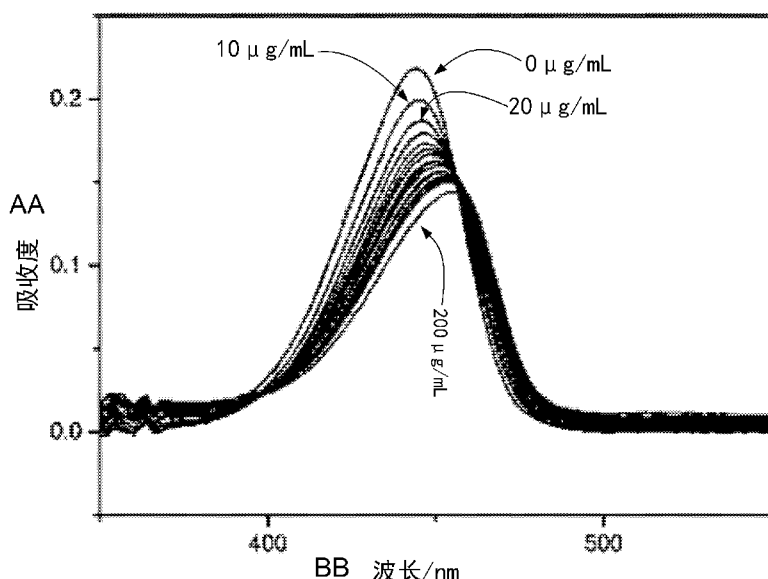


图 1

AA Absorbance BB Wavelength CC General formula I

(57) Abstract: Disclosed are a cyanine compound, a dye containing the cyanine compound, and the use of the cyanine compound. The cyanine compound has a structure of general formula I, wherein X is selected from a group consisting of C(CH₃)₂, O, S and Se; R₁ and R₂ are each independently selected from a group consisting of H, a C₁-C₁₈ alkyl, phenyl, OR₆ and a halogen; and R₃ and R₄ are each independently selected from a group consisting of a C₁-C₁₈ alkyl, a C₁-C₁₈ carboxyl, a C₁-C₁₈ hydroxyl, C₁-C₁₈ NR₅R₆, benzyl and a substituted benzyl, wherein a

超(YAO, Qichao); 中国辽宁省大连市甘井子区
凌工路2号, Liaoning 116024 (CN)。

(74) 代理人: 北京磐华捷成知识产权代理有限公司(P.
C. & ASSOCIATES); 中国北京市朝阳区建国门外
大街22号赛特大厦9层, Beijing 100022 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

substituent of the substituted benzyl is selected from a group consisting of a C₁-C₁₈ alkyl, CN, COOH, NH₂, NO₂, OH, SH, a C₁-C₆ alkoxy, a C₁-C₆ alkylamino, a C₁-C₆ acylamino, halogen and a C₁-C₆ halogenated alkyl. R₅ and R₆ are each independently selected from a group consisting of H and a C₁-C₁₈ alkyl. Y⁻ is an anion. The cyanine compound according to the present invention has a good living cell permeability and is capable of entering a cell without damaging the cell membrane and staining the nucleic acid; and excitation light is blue-green light with a small wavelength.

(57) 摘要: 本发明公开了一种菁类化合物、含菁类化合物染料以及菁类化合物的应用。菁类化合物具有通式I的结构。其中, X选自自由C(CH₃)₂、O、S和Se组成的组。R₁和R₂各自独立地选自自由H、C₁-C₁₈烷基、苯基、OR₆和卤素组成的组、R₃和R₄各自独立地选自自由C₁-C₁₈烷基、C₁-C₁₈羧基、C₁-C₁₈羟基、C₁-C₁₈NR₅R₆、苄基和取代苄基组成的组, 其中取代苄基的取代基选自自由C₁-C₁₈烷基、CN、COOH、NH₂、NO₂、OH、SH、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆烷基氨基、C₁-C₆酰氨基、卤素和C₁-C₆卤代烷基组成的组。R₅和R₆各自独立地选自自由H和C₁-C₁₈烷基组成的组。Y⁻为负离子。根据本发明的菁类化合物, 具有良好的活细胞通透性, 能够在不破坏细胞膜的情况进入细胞对核酸进行染色; 且激发光为波长较小的蓝绿色光。

菁类化合物、含菁类化合物的染料以及菁类化合物的应用

5

技术领域

本发明涉及核酸定量检测及生物染色技术领域，具体而言涉及一种菁类化合物、含菁类化合物的染料以及菁类化合物在定量检测核酸和/或生物染色中的应用。

10

背景技术

DNA (DeoxyriboNucleic Acid, 脱氧核糖核酸) 是一类带有遗传信息的生物大分子。生物体正常细胞均具有比较稳定的 DNA 二倍体含量，只有当发生癌变或具有恶性潜能的癌前病变时，才会发生异常改变。因此对 DNA 的特异性识别和精确测量，尤其是在活细胞内进行检测，在癌症的早期诊断中意义非常重大。

利用荧光技术进行 DNA 的定量分析因具有灵敏度高、响应快、仪器使用便捷等优点而引起广大科研工作者的兴趣。目前，商品化的此类染料主要有菲啶类、吡啶类、咪唑类和花菁家族类等。然而，这些染料都各自存在着应用的局限性。

其一，较大一部分染料与 DNA 结合后呈现荧光淬灭，导致在荧光成像等可视化应用中实用价值不高。其二，有相当一部分染料应用受限于固定细胞，需要通过增大细胞膜的通透性或类似使膜崩解的方法才能对生物样品进行有效的荧光标记。然而，这种固定方法往往对细胞和生物组织真实形态的观察有负面影响，参考[Kozubek S,Lukasova E,Amrichova J,Kozubek M,Liskova A,Slotova J.Anal Biochem2000;282:29-38]。其三，目前多数染料有很大的毒性和致癌性，这就更加限制在活细胞中的应用。

在众多种类的荧光染料中，菁类荧光染料以其波长范围宽，摩尔消光系数大，荧光量子产率适中等优点，作为生物分子荧光探针、CD 和 VCD 记录材料、感光材料光敏剂、光电转换材料等已被广泛的应用。

菁类染料中的有些品种已经商品化，但这些商品化的染料大部分分子较大，结构复杂，属于活细胞非通透性，即不具有活细胞通透性，只能应

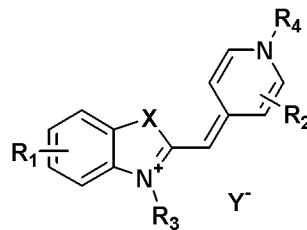
用于活体外核酸的识别与检测。并且，多数商品菁类染料的激发光（激光器发出的光，或者说染料的吸收光）的波长较大，例如橙光，存在对微小物体的识别性差的问题。

因此，需要一种菁类化合物、含菁类化合物的染料以及菁类化合物的应用，以至少部分地解决以上问题。

发明内容

在发明内容部分中引入了一系列简化形式的概念，这将在具体实施方式部分中进一步详细说明。本发明的发明内容部分并不意味着要试图限定出所要求保护的技术方案的关键特征和必要技术特征，更不意味着试图确定所要求保护的技术方案的保护范围。

为至少部分地解决上述问题，本发明的第一方面提供了一种菁类化合物，其具有通式 I 所示的结构，



通式 I

其中，X 选自由 $C(CH_3)_2$ 、O、S 和 Se 组成的组；

R_1 和 R_2 各自独立地选自由 H、 C_1 - C_{18} 烷基、苯基、 OR_6 和卤素组成的组；

R_3 和 R_4 各自独立地选自由 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 羧基、 C_1 - C_{18} 羟基、 C_1 - $C_{18}NR_5R_6$ 、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由 C_1 - C_{18} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 烷基氨基、 C_1 - C_6 酰氨基、卤素和 C_1 - C_6 卤代烷基组成的组；

R_5 和 R_6 各自独立地选自由 H 和 C_1 - C_{18} 烷基组成的组；

Y^- 为负离子。

根据本发明的菁类化合物，具有良好的活细胞通透性，能够在不破坏细胞膜的情况进入细胞对核酸进行染色，毒性小且致癌性低；并且，本发明的菁类化合物的激发光为波长较小的蓝绿色光，能够识别微小颗粒，提高了对小粒子的检测能力；本发明的菁类化合物能够使用普通绿色或蓝色半导体激光器作为光源，大大降低了使用成本；此外，本发明的菁类化合

物的结构简单，制备其的原料易得，合成产率高，易于实现产业化。

进一步地，所述 X 选自由 $C(CH_3)_2$ 和 S 组成的组。

进一步地，所述 R_1 和所述 R_2 各自独立地选自由 H、 C_1 - C_{12} 烷基、苯基、 OR_6 和卤素组成的组。

5 进一步地，所述 R_1 和所述 R_2 各自独立地选自由 H、 C_1 - C_6 烷基、苯基、 OR_6 和卤素组成的组。

进一步地，所述 R_1 选自由 H、 C_1 - C_6 烷基、苯基和卤素组成的组；

进一步地，所述 R_2 为 H。

进一步地，所述 R_1 选自由 H、甲基、苯基和 Cl 组成的组。

10 进一步地，所述 R_3 和所述 R_4 各自独立地选自由 C_1 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 羧基、 C_1 - C_{12} 羟基、 C_1 - $C_{12}NR_5R_6$ 、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由 C_1 - C_{12} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 烷基氨基、 C_1 - C_6 酰氨基、卤素和 C_1 - C_6 卤代烷基组成的组。

15 进一步地，所述 R_3 和所述 R_4 各自独立地选自由 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 羧基、 C_1 - C_6 羟基、 C_1 - $C_6NR_5R_6$ 、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由 C_1 - C_6 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 烷基氨基、 C_1 - C_6 酰氨基、卤素和 C_1 - C_6 卤代烷基组成的组。

20 进一步地，所述 R_3 选自由 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 羟基、 C_1 - C_6 羧基、 C_1 - $C_6NR_5R_6$ 和苄基组成的组；

进一步地，所述 R_4 选自由 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 羟基、 C_1 - C_6 羧基、和苄基组成的组。

进一步地，所述 R_5 和所述 R_6 各自独立地选自由 H 和 C_1 - C_{12} 烷基组成的组。

25 进一步地，所述 R_5 和所述 R_6 各自独立地选自由 H 和 C_1 - C_6 烷基组成的组。

进一步地，所述 R_5 和所述 R_6 各自独立地为 C_1 - C_6 烷基。

进一步地，所述 R_5 和所述 R_6 为乙基。

30 进一步地，所述 R_3 选自由甲基、乙基、苄基、4-(二乙氨基)丁基、羟丙基和己羧基组成的组。

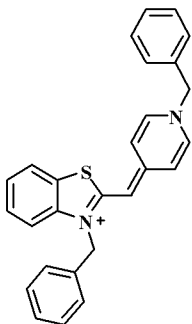
进一步地，所述 R_4 选自由甲基、苄基、羧基戊基和羟丙基组成的组。

进一步地，所述 Y 选自由卤素负离子、 ClO_4^- 、 PF_6^- 、 BF_4^- 、 CH_3COO^-

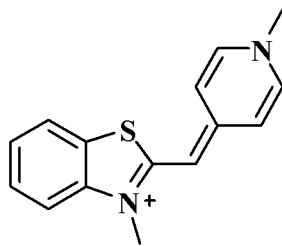
或 OTs⁻组成的组。

进一步地, 所述菁类化合物包含化学式 I、化学式 II、化学式 III、化学式 IV、化学式 V、化学式 VI、化学式 VII、化学式 VIII、化学式 IX、化学式 X、化学式 XI、化学式 XII、化学式 XIII、化学式 XIV、化学式 XV、

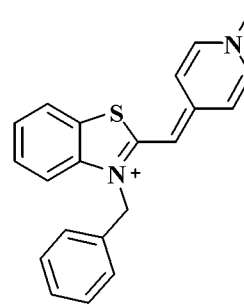
5 化学式 XVI、化学式 XVII 和化学式 XVIII 中的一种所示的结构,



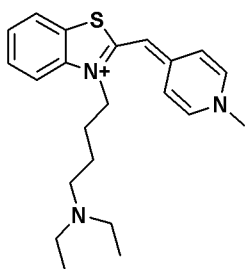
化学式 I



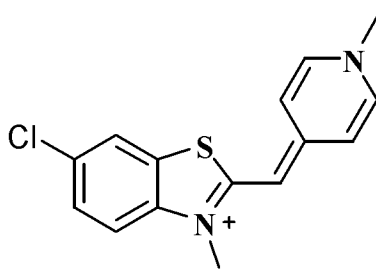
化学式 II



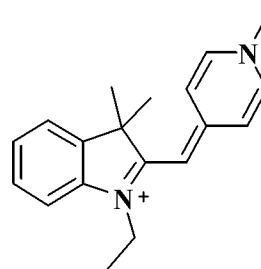
化学式 III



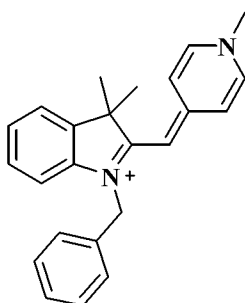
化学式 IV



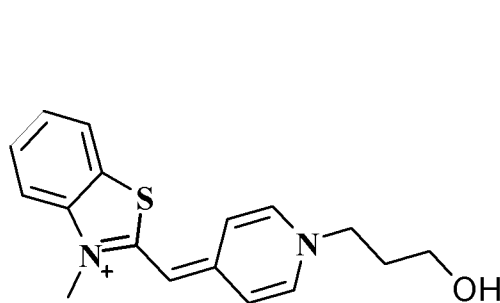
化学式 V



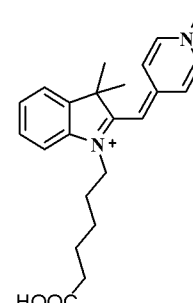
化学式 VI



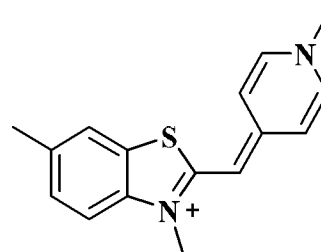
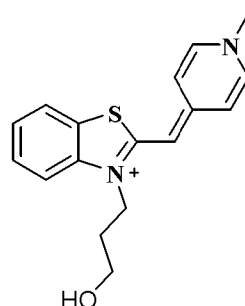
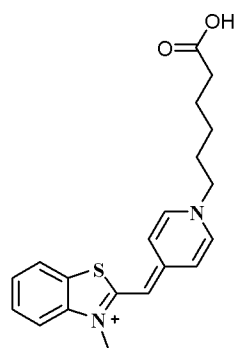
化学式 VII



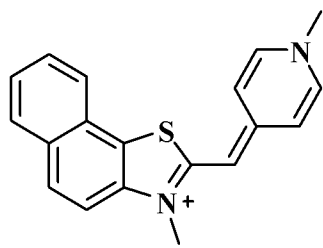
化学式 VIII



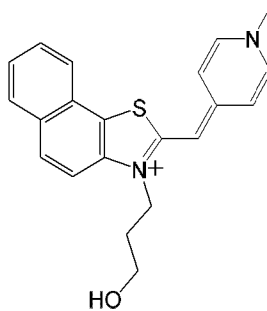
化学式 IX



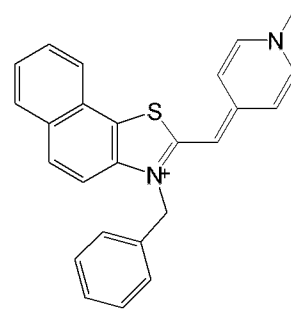
化学式 X



化学式 XI



化学式 XII

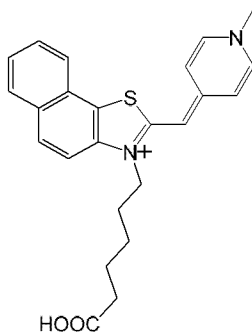


化学式 XIII

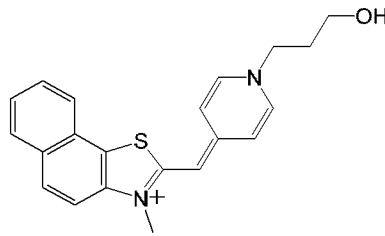
化学式 XIV

化学式 XV

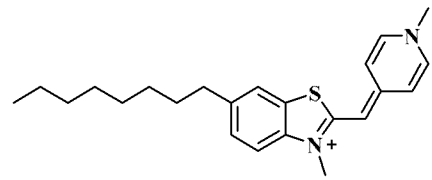
5



化学式 XVI



化学式 XVII



化学式 XVIII

本发明的第二方面提供一种染料，其包括上述第一方面所述的菁类化合物。

根据本发明的染料，包括菁类化合物，具有良好的活细胞通透性，能够在不破坏细胞膜的情况进入细胞对核酸进行染色，毒性小且致癌性低；并且，本发明的菁类化合物的激发光与发射光均为波长较小的蓝绿色光，能够识别微小颗粒，提高了对小粒子的检测能力；本发明的菁类化合物能够使用普通绿色半导体激光器作为光源，大大降低了使用成本；此外，本发明的菁类化合物的结构简单，制备其的原料易得，合成产率高，易于实现产业化。

本发明的第三方面涉及上述第一方面所述的菁类化合物在定量检测核酸和/或生物染色中的应用；或者

涉及上述第二方面的荧光染料在定量检测核酸和/或生物染色中的应用。

附图说明

本发明的下列附图在此作为本发明的一部分用于理解本发明。附图中

示出了本发明的实施例及其描述，用来解释本发明的原理。

附图中：

图 1 示出了根据本发明的实施例 2 的化合物 B 对 DNA 染色后的吸收光谱；

5 图 2 示出了根据本发明的实施例 2 的化合物 B 对 DNA 染色后的荧光光谱；

图 3 示出了根据本发明的实施例 2 的化合物 B 对 RNA 染色后的吸收光谱；

10 图 4 示出了根据本发明的实施例 2 的化合物 B 对 RNA 染色后的荧光光谱；

图 5 示出了根据本发明的实施例 2 的化合物 B 对 DNA 和 RNA 染色后的荧光强度随核酸浓度的变化曲线；

图 6 为根据本发明的实施例 2 的化合物 B 对活细胞染色后的明场显微照片；

15 图 7 为根据本发明的实施例 2 的化合物 B 对活细胞染色后的荧光显微照片；

图 8 为图 6 中的明场显微照片与图 7 中的荧光显微照片的叠加图；

图 9 示出了示出了根据本发明的实施例 3 的化合物 C 对 DNA 染色后的荧光光谱；

20 图 10 示出了根据本发明的实施例 3 的化合物 C 对 RNA 染色后的荧光光谱；

图 11 示出了根据本发明的实施例 3 的化合物 C 对 DNA 和 RNA 染色后的荧光强度随核酸浓度的变化曲线；

25 图 12 为根据本发明的实施例 3 的化合物 C 对活细胞染色后的明场显微照片；

图 13 为根据本发明的实施例 3 的化合物 C 对活细胞染色后的荧光显微照片。

图 14 示出了根据本发明的实施例 13 的化合物 M 对 DNA 染色后的荧光光谱；

30 图 15 示出了根据本发明的实施例 13 的化合物 M 对 RNA 染色后的荧光光谱；

图 16 示出了根据本发明的实施例 13 的化合物 M 对 DNA 和 RNA 染

色后的荧光强度随核酸浓度的变化曲线；

图 17 为根据本发明的实施例 13 的化合物 M 对活细胞染色后的明场显微照片；

图 18 为根据本发明的实施例 13 的化合物 M 对活细胞染色后的荧光显微照片；以及

图 19 为本发明的实施例 21 提供的核酸荧光响应性能对比示意图。

具体实施方式

在下文的描述中，给出了大量具体的细节以便提供对本发明更为彻底的理解。然而，对于本领域技术人员而言显而易见的是，本发明可以无需一个或多个这些细节而得以实施。在其他的例子中，为了避免与本发明发生混淆，对于本领域公知的一些技术特征未进行描述。

为了彻底理解本发明，将在下列的描述中提出详细的描述。显然，本发明实施方式的施行并不限于本领域的技术人员所熟悉的特殊细节。本发明的较佳实施例详细描述如下，然而除了这些详细描述外，本发明还可以具有其他实施方式。

应予以注意的是，这里所使用的术语仅是为了描述具体实施例，而非意图限制根据本发明的示例性实施例。如在这里所使用的，除非上下文另外明确指出，否则单数形式也意图包括复数形式。此外，还应当理解的是，当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时，其指明存在所述特征、整体、步骤、操作、元件和/或组分，但不排除存在或附加一个或多个其他特征、整体、步骤、操作、元件、组分和/或它们的组合。

特别地，如本申请自始至终所使用的，术语烷基可以在最广义上理解为任何线性、支化或环状的烷基取代基。如本文使用的术语“C₁₋₁₈ 烷基”一般指在构型中具有 1 至 18 个碳原子的饱和烃基团，C₁₋₁₈ 烷基包括但不限于 C₁₋₁₂ 烷基、C₁₋₆ 烷基等。在未描述为“取代烷基”的情况下，术语“烷基”通常指未取代的烷基。示例性地，术语烷基包括取代基甲基 (Me)，乙基 (Et)，正丙基 (nPr)，异丙基 (iPr)，环丙基，正丁基 (nBu)，异丁基 (iBu)，仲丁基 (sBu)，叔丁基 (tBu)，环丁基，2-甲基丁基，正戊基，仲戊基，叔戊基，2-戊基，新戊基，环戊基，正己基，仲己基，叔己基，2-己基，3-己基，新己基，环己基，1-甲基环戊基，2-甲基戊基，正庚基，2-庚基，3-庚基，4-庚基，环庚基，1-甲基环己基，正辛基，2-乙基己基，

环辛基, 1-双环[2,2,2]辛基, 2-双环[2,2,2]-辛基, 2-(2,6-二甲基)辛基, 3-(3,7-二甲基)辛基, 金刚烷基, 2,2,2-三氟乙基, 1,1-二甲基-正己-1-基, 1,1-二甲基-正庚-1-基, 1,1-二甲基-正辛-1-基, 1,1-二甲基-正癸-1-基, 1,1-二甲基-正十二烷-1-基, 1,1-二甲基-正十四烷-1-基, 1,1-二甲基-正十六烷-1-基, 1,1-二甲基-正十八烷-1-基, 1,1-二乙基-正己-1-基, 1,1-二乙基-正庚-1-基, 1,1-二乙基-正辛-1-基, 1,1-二乙基-正癸-1-基, 1,1-二乙基-正十二烷-1-基, 1,1-二乙基-正十四烷-1-基, 1,1-二乙基-正十六烷-1-基, 1,1-二乙基-正十八烷-1-基, 1-(正丙基)-环己-1-基, 1-(正丁基)-环己-1-基, 1-(正己基)-环己-1-基, 1-(正辛基)-环己-1-基和 1-(正癸基)-环己-1-基等。

10 如上文和此处所使用的, 术语羧基包括任何线性、支化或环状的羧基取代基。如本文使用的术语 C_{1-18} 羧基一般指在构型中具有 1 至 18 个碳原子的羧基取代基团, C_{1-18} 羧基包括但不限于 C_{1-12} 羧基、 C_{1-6} 羧基等。特别的, 术语羧基指与如前文定义的烷基连接的具有羧基的基团。术语羧基示例性地包括甲羧基, 乙羧基(羧基甲基), 丙羧基(羧基乙基), 丁羧基(羧基丙基), 戊羧基(羧基丁基)、己羧基(羧基戊基)、庚羧基(羧基己基)和辛羧基(羧基庚基), 以及它们的同分异构体等。

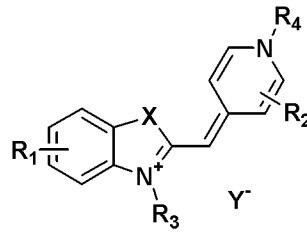
如上文和此处所使用的, 术语羟基包括任何线性、支化或环状的羟基取代基。如本文使用的术语 C_{1-18} 羟基一般指在构型中具有 1 至 18 个碳原子的羟基取代基团, C_{1-18} 羟基包括但不限于 C_{1-12} 羟基、 C_{1-6} 羟基等。特别的, 术语羟基指与如前文定义的烷基连接的具有羟基的基团。术语羟基示例性地包括羟甲基, 羟乙基, 羟丙基, 羟丁基, 羟戊基、羟己基、羟庚基和羟辛基, 以及它们的同分异构体等。

如上文和此处所使用的, 术语烷氧基包括任何线性、支化或环状的烷氧基取代基。特别的, 术语烷氧基指与如前文定义的烷基连接的烷氧基基团。术语烷氧基示例性地包括甲氧基, 乙氧基, 正丙氧基, 异丙氧基, 正丁氧基, 异丁氧基, 仲丁氧基, 叔丁氧基和 2-甲基丁氧基等。

如上文和此处所使用的, 术语“卤素”和“卤代”可以在最广泛的意义上理解为优选氟、氯、溴或碘。

如本文所使用的, 如果在特定的上下文中没有更具体地定义, 发射的光的颜色的指定如下: 蓝绿色波长约在 420-560 nm 的范围。

本发明的第一方面提供了一种菁类化合物, 其具有通式 I 所示的结构,



通式 I

其中, X 选自由 $C(CH_3)_2$ 、O、S 和 Se 组成的组。优选地 X 选自由 $C(CH_3)_2$ 和 S 组成的组。

- 5 R_1 和 R_2 各自独立地选自由 H、 C_1 - C_{18} 烷基、苯基、 OR_6 和卤素组成的组。优选地, R_1 和 R_2 各自独立地选自由 H、苯基、 C_1 - C_{18} 烷基和卤素组成的组。优选地, R_1 选自由 H、苯基、 C_1 - C_{18} 烷基和卤素组成的组。优选地, R_1 选自由 H、苯基、 C_1 - C_{18} 烷基和 Cl 组成的组。优选地, R_2 选自由 H、苯基和卤素组成的组。优选地, R_2 为 H。
- 10 R_3 和 R_4 各自独立地选自由 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 羧基、 C_1 - C_{18} 羟基、 C_1 - $C_{18}NR_5R_6$ 、苄基和取代苄基组成的组, 其中所述取代苄基的取代基选自由 C_1 - C_{18} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 烷基氨基、 C_1 - C_6 酰氨基、卤素和 C_1 - C_6 卤代烷基组成的组。优选地, R_3 和 R_4 各自独立地选自由 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 羧基、 C_1 - C_{18} 羟基、 C_1 - $C_{18}NR_5R_6$ 和苄基组成的组。其中, R_3 优选为 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 羟基、 C_1 - C_{18} 羧基、 C_1 - $C_{18}NR_5R_6$ 和苄基组成的组; R_4 优选为 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 羟基、 C_1 - C_{18} 羧基和苄基组成的组。

R_3 和 R_4 选用极性较大的基团, 能够适当增大分子极性, 减小了对细胞中膜脂和蛋白等输水物质的结合力, 提高了对核酸的特异性结合。

- 20 R_5 和 R_6 各自独立地选自由 H 和 C_1 - C_{18} 烷基组成的组。优选地, R_5 和 R_6 各自独立地为 C_1 - C_{18} 烷基。

Y 为负离子。

- 具体地, 上述 C_1 - C_{18} 烷基可以进一步为 C_1 - C_{12} 烷基。优选地, 该 C_1 - C_{12} 烷基可以进一步为 C_1 - C_6 烷基。更优选地, C_1 - C_6 烷基可以为甲基、乙基、丙基和丁基组成的组。特别地, R_5 和 R_6 各自独立地为乙基。特别地, R_3 和 R_4 可以各自独立地为甲基, R_3 还可以为乙基。示例性地, 上述 C_1 - C_6 烷基可以为直链烷基, 也可以为与直链烷基呈同分异构体的支链烷基。

上述 C_1 - C_{18} 羧基可以进一步为 C_1 - C_{12} 羧基。优选地, 该 C_1 - C_{12} 羧基可以进一步为 C_1 - C_6 羧基。更优选地, C_1 - C_6 羧基可以为甲羧基、乙羧基、丙

羧基、丁羧基、戊羧基和己羧基组成的组。特别的， R_3 和 R_4 可以各自独立地为己羧基（羧基戊基）。示例性地，上述 C_1-C_6 羧基可以为直链羧基，也可以为与直链羧基呈同分异构体的支链羧基。

上述 C_1-C_{18} 羟基可以进一步为 C_1-C_{12} 羟基。优选地，该 C_1-C_{12} 羟基可以进一步为 C_1-C_6 羟基。更优选地， C_1-C_6 羟基可以为羟甲基、羟乙基、羟丙基和羟丁基组成的组。特别地， R_4 可以为羟丙基。示例性地，上述 C_1-C_6 羟基可以为直链羟基，也可以为与直链羟基呈同分异构体的支链羟基。

上述 $C_1-C_{18}NR_5R_6$ 可以进一步为 $C_1-C_{12}NR_5R_6$ 。优选地， $C_1-C_{12}NR_5R_6$ 可以进一步为 $C_1-C_6NR_5R_6$ 。更优选地， $C_1-C_6NR_5R_6$ 可以由 $-CH_2NR_5R_6$ 、 $-(CH_2)_2NR_5R_6$ 、 $-(CH_2)_3NR_5R_6$ 、 $-(CH_2)_4NR_5R_6$ 和 $-(CH_2)_5NR_5R_6$ 组成的组。进一步优选地， R_3 和 R_4 各自独立地为 $-(CH_2)_4NR_5R_6$ 。特别地， R_3 可以为 4-(二乙氨基) 丁基。

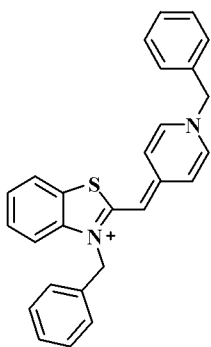
根据本发明的菁类化合物，具有良好的活细胞通透性，能够在不破坏细胞膜的情况进入细胞对核酸进行染色，毒性小且致癌性低。

并且，本发明的菁类化合物的激发光为波长较小的蓝绿色光，能够识别微小颗粒，提高了对小粒子的检测能力。

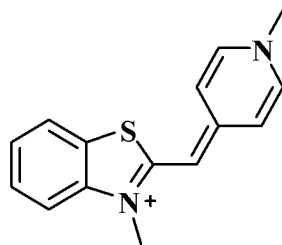
本发明的菁类化合物能够使用普通绿色半导体激光器作为光源，大大降低了使用成本。

此外，根据本发明的菁类化合物的结构简单，制备其的原料易得，合成产率高，易于实现产业化。

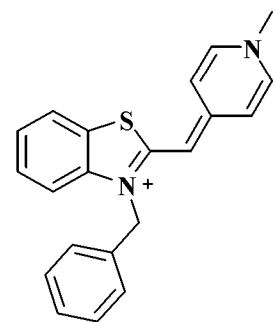
更具体地，本发明的菁类化合物可以为包含化学式 I、化学式 II、化学式 III、化学式 IV、化学式 V、化学式 VI、化学式 VII、化学式 VIII、化学式 IX、化学式 X、化学式 XI、化学式 XII、化学式 XIII、化学式 XIV、化学式 XV、化学式 XVI、化学式 XVII 和化学式 XVIII 中的一种所示的结构，



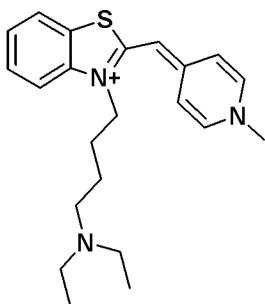
化学式 I



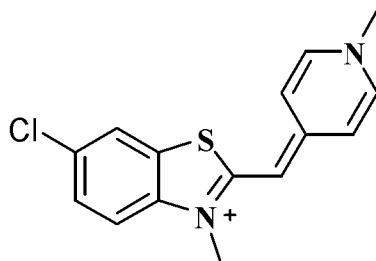
化学式 II



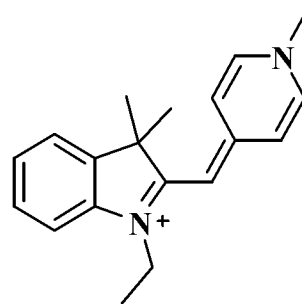
化学式 III



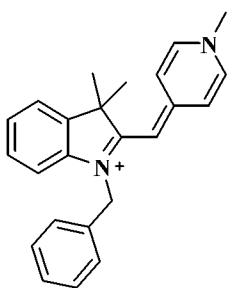
化学式 IV



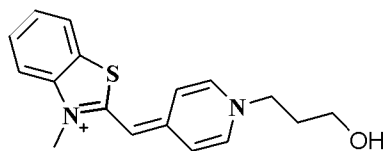
化学式 V



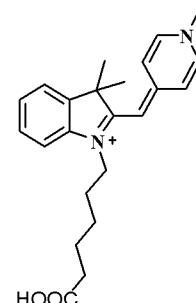
化学式 VI



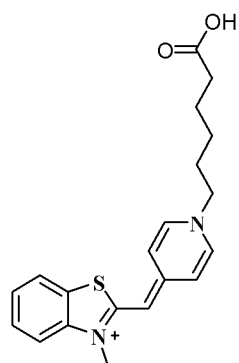
化学式 VII



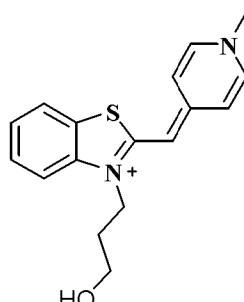
化学式 VIII



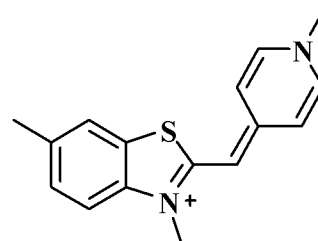
化学式 IX



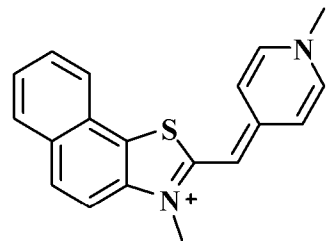
化学式 X



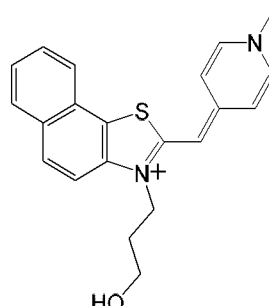
化学式 XI



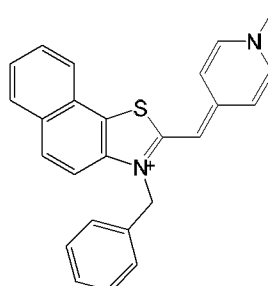
化学式 XII



化学式 XIII



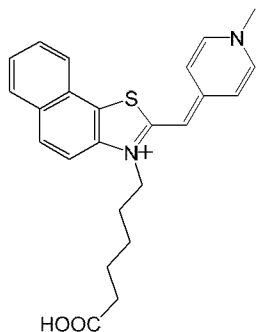
化学式 XIV



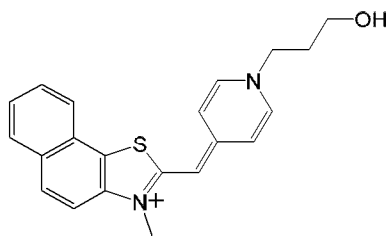
化学式 XV

5

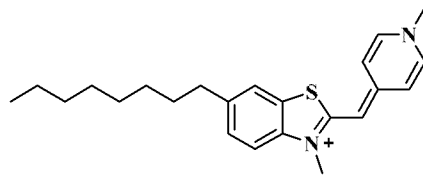
10



化学式 XVI



化学式 XVII

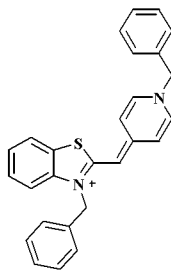


化学式 XVIII

5 现在，将参照实施例更详细地描述本发明。然而，这些示例性实施例可以多种不同的形式来实施，并且不应当被解释为只限于这里所阐述的实施例。应当理解的是，提供这些实施例是为了使得本发明的公开彻底且完整，并且将这些示例性实施例的构思充分传达给本领域普通技术人员。

实施例 1

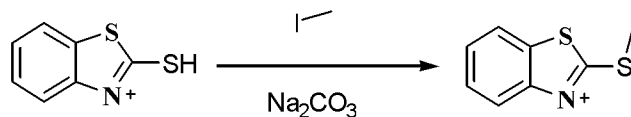
制备具有化学式 I 所示的结构化合物 A，



化学式 I。

在本实施方式中，X 为 S，R₁ 为 H，R₂ 为 H，R₃ 为苄基，R₄ 为苄基。化合物 A 的具体制备方法如下：

第一步，根据下述反应式 I 制备 2-甲硫基苯并噻唑（反应 I 右侧），



反应式 I。

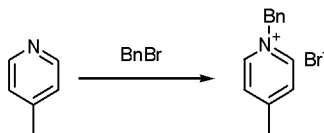
量取 20mL 的 DMF 放入容器中，将 10mmol 的 2-巯基苯并噻唑（反应式 I 左侧）、11mmol 的甲烷以及 12mmol 的碳酸钠加入容器。在氮气保护及温度为 110℃ 的条件下搅拌反应 8 小时，之后停止反应。

20 将得到的混合物冷却至室温，之后将其倾入大量水中。使用适量的乙酸乙酯萃取 3 次，合并萃取的有机相。使用蒸馏水洗涤上述有机相两次，之后用无水硫酸镁对其进行干燥过夜。

然后将干燥过夜后的物质经过色谱柱纯化，得到约 8.5mmol 的橙黄色

固体粉末，该橙黄色固体粉末即为 2-甲硫基苯并噻唑。反应式 I 的产率约为 85%。

第二步，根据下述反应式 II 制备 1-苄基-4-甲基吡啶季铵盐（反应式 II 右侧），



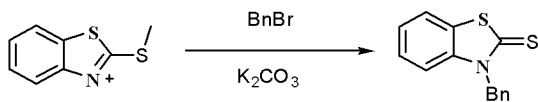
反应式 II。

在容器中量取 50mL 甲苯，将 10mmol 的 4-甲基吡啶（反应式 II 左侧）和 12mmol 的苄溴加入到容器中。在氮气保护的条件下回流并搅拌 8 小时，之后停止反应。

对反应后的混合物进行抽滤，之后使用 50mL 甲苯洗涤滤饼 3 次，得到粗产物。

将上述粗产物经过色谱柱纯化后得到约 7.3mmol 的白色固体粉末，白色固体粉末即为 1-苄基-4-甲基吡啶季铵盐。该反应式 II 的产率约为 73%。

第三步，根据下述反应式 III 制备 3-苄基-2-硫酮苯并噻唑（反应式 III 右侧），



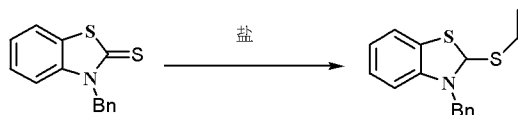
反应式 III。

量取 30mL 甲苯放入容器中，将 3mmol 的第一步反应得到的 2-甲硫基苯并噻唑（反应式 III 左侧）、4mmol 的苄溴以及 5mmol 的碳酸钾加入到容器中。在氮气保护及温度为 110℃ 的条件下搅拌反应 8 小时。

对反应后的混合物进行抽滤，之后使用 50mL 甲苯洗涤滤饼 3 次，得粗产物。

将上述粗产物经过色谱柱纯化后得到约 2.1mmol 的白色固体粉末，该白色固体粉末即为 3-苄基-2-硫酮苯并噻唑，反应式 III 的产率约为 70%。

第四步，根据下述反应式 IV 制备 3-苄基-2-乙硫基苯并噻唑（反应式 IV 右侧），



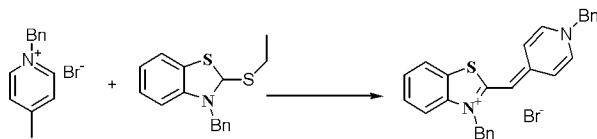
反应式 IV。

在容器中量取 30mL 二氯甲烷，将 2mmol 的第三步反应得到的 3-苄基

-2-硫酮苯并噻唑以及 2mmol 的镁盐加入到容器中。在氮气保护的条件下回流搅拌 24 小时。

产物经过色谱柱纯化后得到约 1.1mmol 的白色固体粉末，该白色固体粉末即为 3-苄基-2-乙硫基苯并噻唑。反应式 IV 的产率约为 55%。

5 第五步，根据下述反应式 V 制备化合物 A（反应式 V 右侧），



反应式 V。

在容器中量取 30mL 的乙醇，称取第二步反应得到的 1-苄基-4-甲基吡啶季铵盐 1mmol，称取第四步反应得到的 3-苄基-2-乙硫基苯并噻唑

10 1mmol，将二者加入到容器中。

在氮气保护地条件下回流搅拌 24 小时。产物经色谱柱纯化后得到约 0.3mmol 橙黄色固体粉末，该橙黄色固体粉末即为化合物 A。反应式 V 的产率约为 30%。

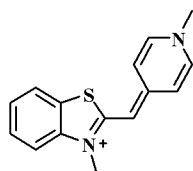
对化合物 A 进行核磁共振测试，结果如下。

15 $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO, TMS) : δ 4.00 (s, 3H) , 5.59 (s, 2H) , 6.39 (s, 1H) , 7.26-7.31 (m, 4H) , 7.35-7.38 (t, 2H) , 7.40-7.42 (d, 2H) , 7.45-7.48 (t, 1H) , 7.52-7.54 (d, 1H) , 7.94-7.96 (d, 1H) , 8.33-8.35 (d, 2H) 。

经验证，测试结果符合化学式 I 的结构。

20 实施例 2

制备具有化学式 II 所示的结构化合物 B，



化学式 II。

在本实施方式中，X 为 S， R_1 为 H， R_2 为 H， R_3 为甲基， R_4 为甲基。

25 化合物 B 的具体制备方法如下：

第一步，量取 5mL 二氯甲烷放入 25mL 容量的圆底烧瓶中，将 10mmol 的 4-甲基吡啶和 10mmol 的碘甲烷加入到上述圆底烧瓶中。在氮气保护及室温的条件下搅拌 1h 后停止反应。

对得到的混合物进行沉淀并过滤，使用二氯甲烷洗涤滤饼。将滤出物

干燥后得到白色颗粒状固体，其为 1,4-二甲基吡啶季铵盐。上述反应的粗收率约为 97%。

第二步，量取 10mL 无水四氢呋喃放入 50mL 容量的圆底烧瓶中，将 11.84mmol 的 2-巯基苯并噻唑加入该圆底烧瓶。在搅拌的条件下，向圆底
5 烧瓶中缓慢滴加 14.21mmol 的碘甲烷，反应过夜。

在得到的混合物中加入少量石油醚，静置沉淀后过滤，使用大量石油醚洗涤滤饼。将滤出物干燥后得到白色固体，其为 2-甲巯基苯并噻唑。第二步反应的粗收率约为 98%。

第三步，量取 10mL 甲苯放入 50mL 容量的圆底烧瓶中，将 10mmol
10 第二步得到的 2-甲巯基苯并噻唑加入其中。在氮气保护的条件下，向圆底烧瓶中缓慢滴加 12mmol 碘甲烷，以 110℃ 的温度回流反应 24h。

将得到的混合物冷却到室温后沉淀并过滤，使用二氯甲烷洗涤滤饼。将滤出物干燥后得到微黄色固体粉末，其为 3-甲基-2-甲巯基苯并噻唑季铵盐。第三步反应的粗收率约为 30%。

15 第四步，量取 5mL 无水乙醇放入 50mL 容量的双口圆底烧瓶中，将 3mmol 第三步反应得到的 3-甲基-2-甲巯基苯并噻唑加入到其中。

在氮气保护的条件下，向双口圆底烧瓶内滴加 10mmol 三乙胺同时搅拌。将 3.5mmol 第一步得到的 1,4-二甲基吡啶季铵盐溶于 5mL 的无水乙醇中，将所得到的溶液滴加入上述双口圆底烧瓶内。在 60℃ 的温度下回流反
20 应 7h。之后将反应液蒸干，使其通过中性硅胶色谱柱分离，分离过程中使用二氯甲烷和甲醇得混合溶剂作为洗脱液。收集分离后的黄色组分，将其蒸干干燥，得黄色固体粉末，其即为化合物 B，其粗收率约为 20%。

对化合物 B 进行核磁共振测试，结果如下。

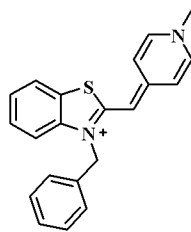
¹H-NMR (500MHz, DMSO, TMS) : δ3.73 (s, 3H) , 3.99 (s, 3H) ,
25 6.25 (s, 1H) , 7.29-7.32 (t, 1H) , 7.40-7.41 (d, 2H) , 7.51-7.54 (t, 1H) , 7.58-7.60 (d, 1H) , 7.90-7.92 (d, 1H) , 8.29-8.30 (d, 2H) 。

经验证，测试结果符合化学式 II 的结构。

实施例 3

制备具有化学式 III 所示的结构化合物 C，

16



化学式 III。

在本实施方式中，X 为 S，R₁ 为 H，R₂ 为 H，R₃ 为苄基，R₄ 为甲基。
化合物 C 的具体制备方法如下：

- 5 第一步，量取 10mL 甲苯放入 50mL 容量的圆底烧瓶中，将 10mmol 的 2-甲硫基苯并噻唑加入到其中。在氮气保护下，向圆底烧瓶内缓慢滴加 12mmol 苄溴，同时在 110℃ 的温度下持续回流反应 24h。

10 将反应得到的混合物冷却到室温，之后对混合物进行沉淀并过滤，使用二氯甲烷洗涤滤饼。将滤出物干燥后得到棕黄色固体粉末，即为 3-苄基-2-硫酮苯并噻唑，其粗收率约为 25%。

15 第二步，量取 5mL 二氯甲烷放入 25mL 容量的圆底烧瓶中，再将 0.4mmol 的 3-苄基-2-硫酮苯并噻唑加入其中，在液氮冷却至 -20℃ 的条件下搅拌缓慢滴加 0.5mmol 三乙基氧鎓四氟硼酸，持续搅拌 6h 后反应停止。混合物加入过量石油醚静置沉淀过滤，并用石油醚洗涤滤饼。干燥后得到白色固体粉末，3-苄基-2-乙硫基苯并噻唑季铵盐，粗收率 30%。

20 第三步，将 5mL 无水乙醇加入 50mL 容量的双口圆底烧瓶中，称取第二步反应得到的 3-苄基-2-乙硫基苯并噻唑 3mmol，将其加入到上述双口圆底烧瓶中。

25 在氮气保护并搅拌的条件下，向双口圆底烧瓶中滴加 10mmol 三乙胺。将 3.5mmol 的 1,4-二甲基吡啶溶于 5mL 的无水乙醇中，之后将溶液滴加到上述双口圆底烧瓶内，并在 60℃ 温度下回流反应 7h。之后将反应液蒸干，通过中性硅胶色谱柱分离，在分离过程中使用二氯甲烷和甲醇混合溶剂作为洗脱液。收集分离后的黄色组分并蒸干进行干燥，得到黄色固体粉末，即化合物 C，其粗收率约为 22%。

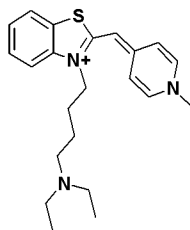
25 对化合物 C 进行核磁共振测试，结果如下。

¹H-NMR (500MHz, DMSO, TMS) : δ 4.00 (s, 3H), 5.59 (s, 2H), 6.39 (s, 1H), 7.26-7.31 (m, 4H), 7.35-7.38 (t, 2H), 7.40-7.42 (d, 2H), 7.45-7.48 (t, 1H), 7.52-7.54 (d, 1H), 7.94-7.96 (d, 1H), 8.33-8.35 (d, 2H)。

经验证, 测试结果符合化学式 III 的结构。

实施例 4

制备具有化学式 IV 所示的结构化合物 D,



化学式 IV。

在本实施方式中, X 为 S, R₁ 为 H, R₂ 为 H, R₃ 为 4-(二乙氨基)丁基, R₄ 为甲基。

化合物 D 的具体制备方法如下:

第一步, 将 13.4mmol(2g, 1eq)的 2-甲基苯并噻唑和 67.0mmol(14.52g, 5eq)的 1,4-二溴丁烷加入至 20mL 容量的微波管中, 将其微波加热至 140℃ 反应 3 小时。

之后对微波管降温, 有大量固体析出。对反应液进行过滤, 得到的滤饼与 20mL 乙酸乙酯在室温下进行打浆, 再次过滤。将滤出物真空干燥后得到 2.5g 白色固体, 其为 3-(4-溴丁基)-2-甲基苯并噻唑季胺盐。

第二步, 将 10mmol (2.05g, 1eq) 的 4-碘吡啶和 50mmol (7.1g, 5eq) 的碘甲烷加入至 20mL 容量的微波管中, 并在微波管中加入 10mL 二氯甲烷。

将微波管通过微波加热至 60℃, 并维持反应 2 小时。之后对其降温, 有大量固体析出。对反应液进行过滤, 得到的滤饼与 20mL 乙酸乙酯在室温下进行打浆, 再次过滤。将滤出物真空干燥后得到 2.0g 棕色固体, 其为 1-甲基-4-碘吡啶季胺盐。

第三步, 在 20mL 容量的微波管中加入 10mL 甲醇, 称取 2.75mmol(1g, 1eq) 的第一步反应得到的 3-(4-溴丁基)-2-甲基苯并噻唑季胺盐并将其溶解在微波管内的甲醇中。

在室温下称取 2.75mmol (955mg, 1eq) 的第二步反应得到的 1-甲基-4-碘吡啶季胺盐, 称取 5.5mmol (462mg, 2.5eq) 的碳酸氢钠, 将二者分别加入反应瓶(微波管)中。

将反应瓶微波加热至 60℃, 并维持 2 小时。之后对反应液进行降温过滤, 滤液浓缩后, 通过硅胶柱分离, 分离过程中用二氯甲烷和甲醇的混合

液作为洗脱剂。收集分离产物，得 400mg 的黄色固体粉末，即为 3-(4-溴丁基)-2-((1-甲基吡啶-4(1H)-亚甲基)甲基)苯并噻唑，其收率约为 32%。

第四步，称取 0.88mmol (400mg, 1eq) 的第三步的到的 3-(4-溴丁基)-2-((1-甲基吡啶-4(1H)-亚甲基)甲基)苯并噻唑，称取 4.4mmol (321mg, 5eq) 的二乙基胺，并将二者均加入到 20mL 容量的微波管中。

将上述微波管微波加热至 60℃，并维持 2 小时。之后对反应液进行降温过滤，滤液浓缩后，通过硅胶柱分离，分离过程中用二氯甲烷和甲醇的混合液作为洗脱剂。收集分离产物，得到 150mg 的黄色固体粉末，即化合物 D，其名称为 3-(4-(二乙氨基)丁基)-2-((1-甲基吡啶-4(1H)-亚甲基)甲基)苯并噻唑季胺盐。化合物 D 的收率约为 38%。

对化合物 D 进行液相色谱-质谱连用测试，结果如下。

LCMS: Calculated Exact Mass = 368.22, Found $[M+H]^+$ (ESI+) = 368.22。

结果显示对化合物 D 的分子量的计算值与测试值对应，证明化合物 D 具有化学式 IV 的结构。

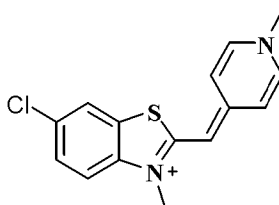
对化合物 D 进行核磁共振测试，结果如下。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO) : δ 8.33 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 7.93 (d, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.46 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.12 (d, $J=5.8\text{Hz}$, 6H), 1.78 (s, 4H), 1.20 (d, $J=15.5, 8.3\text{Hz}$, 8H)。

经验证，测试结果符合化学式 IV 的结构。

实施例 5

制备具有化学式 V 所示的结构化合物 E，



化学式 V。

在本实施方式中，X 为 S， R_1 为 Cl， R_2 为 H， R_3 为甲基， R_4 为甲基。化合物 E 的具体制备方法如下：

在 50mL 容量的双口圆底烧瓶中 5mL 无水乙醇，之后加入 3mmol 的 3-甲基-2-甲硫基-6-氯苯并噻唑。在氮气保护并搅拌的条件下，向双口圆底烧瓶中滴加 10mmol 三乙胺。

将 3.5mmol 的 1,4-二甲基吡啶溶于 5mL 无水乙醇中，将所得到的溶液

滴加至上述双口圆底烧瓶内，并在 60℃ 温度下回流反应 7h。

将反应液蒸干后通过中性硅胶柱进行分离，分离过程中使用二氯甲烷和甲醇得混合溶剂作为洗脱液。收集分离得到的黄色组分，将其蒸干干燥，最终得到黄色固体粉末，即化合物 E，其粗收率约为 20%。

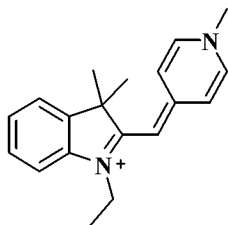
5 对化合物 E 进行核磁共振测试，结果如下。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO, TMS) : δ 3.73 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 6.25 (s, 1H), 7.29-7.32 (t, 1H), 7.40-7.41 (d, 2H), 7.51-7.54 (t, 1H), 7.58-7.60 (s, 1H), 8.29-8.30 (d, 2H)。

经验证，测试结果符合化学式 V 的结构。

10 实施例 6

制备具有化学式 VI 所示的结构化合物 F，



化学式 VI。

15 在本实施方式中，X 为 C(CH₃)₂，R₁ 为 H，R₂ 为 H，R₃ 为乙基，R₄ 为甲基。

化合物 F 的具体制备方法如下：

第一步，将 25mmol (4g, 1eq) 的 2,3,3-三甲基-3H-吲哚和 37.7mmol (5.89g, 1.5mmol) 的碘乙烷加入至 20mL 容量的微波管中，并在其中加入 5mL 甲苯。

20 将微波管微波加热至 140℃，反应 3 小时。反应结束后对微波管降温，有大量固体析出。将反应液过滤，将滤饼与 20mL 的乙酸乙酯在室温下打浆，再次过滤。将最后得到的固体真空干燥，最终得到 7.34g 红色固体，即为 1-乙基-2,3,3-三甲基-3-氢吲哚季胺盐。

25 第二步，将 10mmol (2.05g, 1eq) 的 4-碘吡啶和 100mmol (14.2g, 10eq) 的碘甲烷加入到 100mL 容量的单口瓶中。在氮气保护及 60℃ 油浴的条件下搅拌反应 3 小时。反应结束后对单口瓶降温，有大量固体析出。将反应液过滤，将滤饼与 20mL 的乙酸乙酯在室温下打浆，再次过滤。将第二次过滤得到的固体真空干燥，最终得到 2.0g 的棕色固体，即为 1-甲基-4-碘吡啶季胺盐。

第三步, 称取 3.17mmol (1g, 1eq) 的由第一步得到的 1-乙基-2,3,3-三甲基-3-氢吡啶季胺盐, 将其溶解在反应瓶内的 10mL 乙腈中。

称取 3.17mmol (1g, 1eq) 的由第二步反应得到的 1-甲基-4-碘吡啶季胺盐, 称取 7.94mmol (665mg, 2.5eq) 的碳酸氢钠, 在室温下将二者分别加入反应瓶中。将反应瓶微波加热到 100℃ 并维持反应 2 小时。

反应结束后使用二氯甲烷萃取反应液, 对萃取得到的有机相依次进行水洗、饱和氯化钠溶液洗涤、无水硫酸钠干燥以及浓缩。之后将浓缩产物通过硅胶柱分离, 分离过程中使用二氯甲烷和甲醇的混合液作为洗脱剂, 收集得到 500mg 的黄色油状粗产品。将粗产品用 Pre-HPLC 处理得到 100mg 黄色油状最终产物, 即为化合物 F。

对化合物 F 进行液相色谱-质谱连用测试, 结果如下。

LCMS: Calculated Exact Mass: 279.19, Found $[M+H]^+$ (ESI+) = 279.2。

结果显示对化合物 F 的分子量的计算值与测试值对应, 证明化合物 F 具有化学式 VI 的结构。

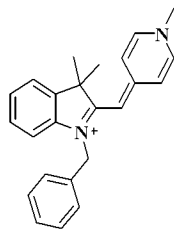
对化合物 F 进行核磁共振测试, 结果如下。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO): δ 8.33 (s, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.42-7.40 (m, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.06 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 5.76 (s, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.92 (s, 2H), 1.73 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.32 (s, 3H)。

经验证, 测试结果符合化学式 VI 的结构。

实施例 7

制备具有化学式 VII 所示的结构化合物 G,



化学式 VII。

在本实施方式中, X 为 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$, R_1 为 H, R_2 为 H, R_3 为苄基, R_4 为甲基。

化合物 G 的具体制备方法如下:

第一步, 将 12mmol (2g, 1eq) 的 2,3,3-三甲基-3H-吡啶和 60mmol (10g, 5mol) 的溴化苄加入至 20mL 容量的微波管中。对微波管进行微波加热,

使其在 140℃ 条件下反应 1 小时。反应结束后对其进行降温,有大量固体析出。将反应液过滤,将滤饼与 20mL 的乙酸乙酯在室温下打浆,再次过滤。将第二次过滤得到的固体真空干燥,最终得到 1.7g 白色固体,即为 1-苄基-2,3,3-三甲基-3-氢吡啶季胺盐。

- 5 第二步,将 10mmol (2.05g, 1eq) 的 4-碘吡啶和 100mmol (14.2g, 10eq) 的碘甲烷加入 100mL 容量的单口瓶中,在氮气保护和 60℃ 油浴的条件下搅拌反应 3 小时。反应结束后对单口瓶进行降温,有大量固体析出。将反应液过滤,将滤饼与 20mL 的乙酸乙酯在室温下打浆,再次过滤。将第二次过滤得到的固体真空干燥,最终得到 2.0g 棕色固体,即为 1-甲基-4-碘吡啶季胺盐。
- 10

第三步,在反应器中加入 10 毫升的二氯甲烷,称取由第一步反应得到的 1-苄基-2,3,3-三甲基-3-氢吡啶季胺盐 3mmol (1g, 1eq), 将其溶解在二氯甲烷中。然后在反应器中加入 1mL 的甲醇

- 在室温下称取 3mmol (1.1g, 1eq) 的由第二步反应得到的 1-甲基-4-碘吡啶季胺盐,称取 7mmol (630mg, 2.3eq) 的碳酸氢钠,将二者分别加入反应器中,之后在室温下搅拌反应 3 小时。反应结束后,将反应液过滤并浓缩,通过硅胶柱将浓缩液分离,分离过程中使用二氯甲烷和甲醇的混合液作为洗脱剂。收集分离产物,得 366mg 的黄色固体粉末,即为化合物 G, 其收率约为 35.2%。
- 15

- 20 对化合物 G 进行液相色谱-质谱连用测试,结果如下。

LCMS: Calculated Exact Mass =341.2, Found $[M+H]^+$ (ESI+) =341.2。

结果显示对化合物 G 的分子量的计算值与测试值对应,证明化合物 G 具有化学式 VII 的结构。

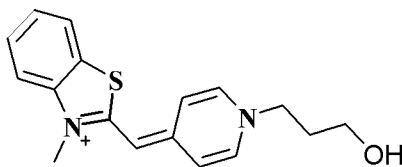
对化合物 G 进行核磁共振测试,结果如下。

- 25 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, MeOD) : δ 8.16 (s, 2H) , 7.61 (s, 1H) , 7.41–7.18 (m, 7H) , 7.09 (s, 2H) , 6.96 (s, 1H) , 5.72 (d, $J=26.5\text{Hz}$, 1H) , 5.10 (d, $J=59.2\text{Hz}$, 2H) , 4.07 (s, 3H) , 1.82 (s, 3H) , 1.50 (s, 3H) 。

经验证,测试结果符合化学式 VII 的结构。

- 30 实施例 8

制备具有化学式 VIII 所示的结构的化合物 H,



化学式 VIII。

在本实施方式中，X 为 S， R_1 为 H， R_2 为 H， R_3 为甲基， R_4 为羟丙基。

化合物 H 的具体制备方法如下：

- 5 在 50mL 容量的双口圆底烧瓶中加入 5mL 无水乙醇，将 2.55mmol 的 3-甲基-2-甲硫基苯并噻唑加入其中。在氮气保护及搅拌的条件下，向双口圆底烧瓶中滴加 10mmol 的三乙胺。

将 3.04mmol 的 1-(3-羟丙基)-4-甲基吡啶溶于 5mL 无水乙醇中，将得到的溶液滴加到上述双口圆底烧瓶内，在 60℃ 条件下加热回流反应 1.5h。

- 10 反应结束后，将反应液蒸干并通过中性硅胶柱分离，分离过程中使用二氯甲烷和甲醇的混合溶剂作为洗脱液。收集分离后的黄色组分，将其蒸干干燥，最终得黄色固体粉末，即为化合物 H，其粗收率约为 20%。

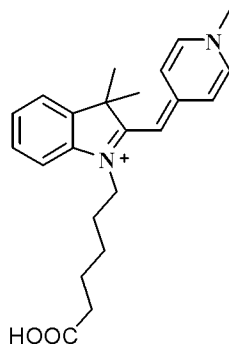
对化合物 H 进行核磁共振测试，结果如下。

- 15 $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO, TMS) : δ 1.95-2.00 (m, 2H) , 3.44 (s, 2H) , 3.74 (s, 3H) , 4.28-4.31 (t, 2H) , 4.74 (s, 1H) , 6.27 (s, 1H) , 7.30-7.33 (t, 1H) , 7.40-7.42 (d, 2H) , 7.51-7.54 (t, 1H) , 7.60-7.61 (d, 1H) , 7.92-7.93 (d, 1H) , 8.35-8.37 (d, 2H) 。

经验证，测试结果符合化学式 VIII 的结构。

实施例 9

- 20 制备具有化学式 IX 所示的结构化合物 I，



化学式 IX。

在本实施方式中，X 为 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ， R_1 为 H， R_2 为 H， R_3 为己羧基， R_4 为甲基。

- 25 化合物 I 的具体制备方法如下：

第一步, 将 25mmol (4g, 1eq) 的 2,3,3-三甲基-3H-吡啶和 37.7mmol (7.3g, 1.5eq) 的 6-溴己酸加入到 20mL 容量的微波管中, 并在其中加入 5mL 甲苯。之后对微波管进行微波加热, 在 140℃ 条件下反应 3 小时。

反应结束后对微波管进行降温, 有大量固体析出。将反应液过滤, 将滤饼与 20mL 的乙酸乙酯在室温下打浆, 再次过滤。将第二次过滤得到的固体真空干燥, 最终得到 7.34g 红色固体, 即为 1-己羧基-2,3,3-三甲基-3-氢吡啶季胺盐。

第二步, 将 10mmol (2.05g, 1eq) 的 4-碘吡啶和 100mmol (14.2g, 10eq) 的碘甲烷加入 100mL 容量的单口瓶中, 在氮气保护下和 60℃ 油浴的条件下搅拌反应 3 小时。

反应结束后对单口瓶进行降温, 有大量固体析出。将反应液过滤, 将滤饼与 20mL 的乙酸乙酯在室温下打浆, 再次过滤。将第二次过滤得到的固体真空干燥, 最终得到 2.0g 棕色固体, 即为 1-甲基-4-碘吡啶季胺盐。

第三步, 盛取 3.17mmol (1g, 1eq) 的由第一步反应得到的 1-己羧基-2,3,3-三甲基-3-氢吡啶季胺盐, 将其溶解在反应瓶内的 10mL 乙腈中。

称取 3.17mmol (1g, 1eq) 的由第二步反应得到的 1-甲基-4-碘吡啶季胺盐, 称取 7.94mmol (665mg, 2.5eq) 的碳酸氢钠, 在室温下将二者分别加入反应瓶中。将反应瓶微波加热到 100℃ 并维持反应 2 小时。

反应结束后使用二氯甲烷萃取反应液, 对萃取得到的有机相依次进行水洗、饱和氯化钠溶液洗涤、无水硫酸钠干燥以及浓缩。之后将浓缩产物通过硅胶柱分离, 分离过程中使用二氯甲烷和甲醇的混合液作为洗脱剂, 收集得到 500mg 的黄色油状粗产品。将粗产品用 Pre-HPLC 处理得到 100mg 黄色油状最终产物, 即为化合物 I。

对化合物 I 进行核磁共振测试, 结果如下。

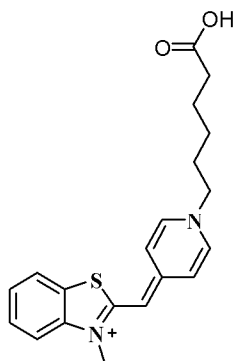
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO): δ 8.33 (s, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.42-7.40 (m, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.06 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 5.76 (s, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.92 (s, 2H), 1.73 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.32 (s, 3H)。

经验证, 测试结果符合化学式 IX 的结构。

30 实施例 10

制备具有化学式 X 所示的结构化合物 J,

24



化学式 X

在本实施方式中，X 为 S，R₁ 为 H，R₂ 为 H，R₃ 为羧基戊基，R₄ 为甲基。

5 化合物 J 的具体制备方法如下：

第一步，在 50mL 容量的圆底烧瓶中装 10mL 乙酸乙酯，将 5.37mmol 的 4-甲基吡啶和 10.7mmol 的 6-溴己酸加入到上述圆底烧瓶中，并在 80℃ 的条件下回流反应 8h。使用乙酸乙酯对得到的混合物进行重结晶并抽滤，抽滤过程中使用乙酸乙酯充分洗涤。将得到的滤出物用甲醇溶解，之后进行蒸干。最终干燥后得到黄色油性液体，其为 1-(5-羧基戊基)-4-甲基吡啶，其粗收率约为 91.07%。

第二步，在 50mL 容量的圆底烧瓶中装 10mL 无水四氢呋喃，将 11.84mmol 的 2-巯基苯并噻唑加入到该圆底烧瓶中，之后在搅拌的状态下缓慢向圆底烧瓶中滴加 14.21mmol 的碘甲烷，反应过夜。之后在反应得到的混合物中加入少量石油醚并静置沉淀。之后过滤，并用大量石油醚洗涤滤出物。最终将滤出物干燥后得到白色固体，其为 2-甲硫基苯并噻唑，其粗收率约为 98%。

第三步，在 50mL 容量的圆底烧瓶中盛装 10mL 甲苯，将 10mmol 的 2-甲硫基苯并噻唑加入到上述圆底烧瓶中。之后在氮气保护下，向该圆底烧瓶中缓慢滴加 12mmol 的碘甲烷，并在 110℃ 及回流的条件下持续反应 24h。将反应得到的混合物冷却到室温，之后对混合物进行过滤，并用二氯甲烷洗涤滤出物。最终将滤出物干燥后得到微黄色固体粉末，其为 3-甲基-2-甲硫基苯并噻唑，其粗收率约为 30%。

第四步，在 25mL 容量的圆底烧瓶中加入 5mL 二氯甲烷。将 0.500mmol 的 3-甲基-2-甲硫基苯并噻唑与 0.509mmol 的 1-(5-羧基戊基)-4-甲基吡啶加入到上述圆底烧瓶中。在室温以及避光的条件下搅拌 10min 后，再向其中缓慢滴加 756μL 三乙胺，之后在室温及避光的条件下反应 21h 左右。之后

将反应得到的混合物蒸干，剩余物通过中性硅胶柱进行分离，其中使用二氯甲烷和甲醇混合溶剂作为洗脱液。收集分离后的黄色组分并对其蒸干干燥，最终得到棕黄色粘稠物，即为化合物 J，其粗收率 50%。

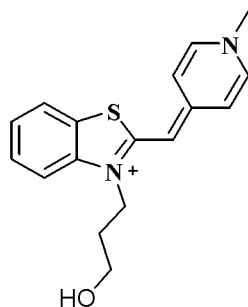
对化合物 J 进行核磁共振测试，结果如下。

- 5 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO) : δ 8.36 (s, 1H) , 7.90 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.58 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H) , 7.51 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 1H) , 7.40 (s, 1H) , 7.30 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 1H) , 6.25 (s, 1H) , 4.21 (s, 1H) , 3.72 (s, 3H) , 2.10 (s, 1H) , 1.82 (s, 1H) , 1.53 (s, 1H) , 1.28 (s, 1H) 。

经验证，测试结果符合化学式 X 的结构。

10 实施例 11

制备具有化学式 XI 所示的结构化合物 K，



化学式 XI

在本实施方式中，X 为 S， R_1 为 H， R_2 为 H， R_3 为羟丙基， R_4 为甲基。

- 15 化合物 K 的具体制备方法如下：

第一步：将 4.88mmol 的 4-碘吡啶和 9.76mmol 的碘甲烷加入到具有 25mL 容量且在其内含有 5mL 四氢呋喃的圆底烧瓶中，在 75℃ 的温度下回流反应 3h。将反应得到的混合物用乙酸乙酯充分洗涤，干燥后得到棕黄色固体粉末，其为 4-碘-1-甲基吡啶季铵盐，粗收率约为 93%。

- 20 第二步：将 670.19mmol 的 2-甲基苯并噻唑加入到 25mL 容量的双口圆底烧瓶中，缓慢向其中滴加 804.23mmol 的 3-溴-1-丙醇，在 80℃ 和回流条件下反应 8h 左右，结束后将反应器冷却到室温。将得到的混合物加入乙醚中进行静置沉淀并过滤，之后使用大量乙醚洗涤滤饼。干燥后得到绿色固体，其为 3-(3-羟丙基)-2-甲基苯并噻唑，粗收率约为 54%。

- 25 第三步：在 25mL 容量的双口圆底烧瓶中装入 4mL 无水甲醇，之后在双口圆底烧瓶中加入 480.08mmol 的上述第二步的得到的 3-(3-羟丙基)-2-甲基苯并噻唑，之后再加入 576.10mmol 的 NaHCO_3 (已溶于 2mL 水中)，在室温下搅拌 0.5h，之后再将 576.10mmol 的上述第一步得到的 4-碘-1-甲

基吡啶加到双口圆底烧瓶内，在 110℃ 和回流条件下反应过夜。将得到的反应液先用水洗涤，然后用二氯甲烷萃取，之后进行干燥浓缩，最后加入乙酸乙酯进行结晶并过滤。将过滤得到的粗产品通过中性硅胶柱分离（洗脱液采用二氯甲烷和甲醇的混合溶剂），收集分离得到的黄色组分并进行
5 蒸干干燥。最终得到黄色固体粉末，即为化合物 K，其粗收率约为 1.12%。

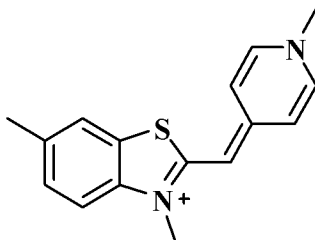
对化合物 K 进行核磁共振测试，结果如下。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO) : δ 8.31 (d, $J=6.7\text{Hz}$, 1H), 7.92 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.60-7.48 (m, 1H), 7.41 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 1H), 7.31 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 6.30 (s, 1H), 4.81 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 4.31 (t, $J=7.2\text{Hz}$,
10 1H), 3.99 (s, 1H), 3.64-3.45 (m, 1H), 2.00-1.73 (m, 1H)。

经验证，测试结果符合化学式 XI 的结构。

实施例 12

制备具有化学式 XII 所示的结构化合物 L，



化学式 XII

在本实施方式中，X 为 S， R_1 为甲基， R_2 为 H， R_3 为甲基， R_4 为甲基。

化合物 L 的具体制备方法如下：

第一步：在 25mL 容量的圆底烧瓶中装入 5mL 四氢呋喃，之后加入 4.88mmol 的 4-碘吡啶和 9.76mmol 的碘甲烷，在 75℃ 和回流的条件下反应
20 3h。将反应得到的混合物用乙酸乙酯进行充分洗涤，干燥后得到棕黄色固体粉末，其为 4-碘-1-甲基吡啶季铵盐，粗收率约为 93%。

第二步：将 612.60mmol 的 2,6-二甲基苯并噻唑加入到 10mL 容量的双口圆底烧瓶中，在搅拌的同时缓慢滴加 1.23mmol 的碘甲烷，之后在 70℃ 的温度下回流反应 1.5h。反应结束后将反应器冷却到室温，在反应得到的
25 混合物中加入乙酸乙酯静置沉淀并过滤，之后使用大量乙酸乙酯洗涤滤饼。将滤出物干燥后得到白色固体，其为 2,3,6-三甲基苯并噻唑，粗收率约为 98%。

第三步：在 25mL 容量的双口圆底烧瓶中装入 4mL 无水甲醇，之后加入 560.94mmol 的上述第二步制得的 2,3,6-三甲基苯并噻唑以及 1.12mmol

的 NaHCO_3 (已溶于 1mL 水中), 在室温条件下搅拌 0.5h。将 673.13mmol 的上述第一步得到的 4-碘-1-甲基吡啶溶于 5mL 的无水甲醇中后, 再滴加到圆底烧瓶内, 在 110°C 及回流的条件下反应 8h。将得到的反应液用先水洗涤, 然后用二氯甲烷萃取, 之后进行干燥浓缩, 最后加入乙酸乙酯进行结晶并过滤。过滤得到的粗产品通过中性硅胶柱进行分离 (二氯甲烷和甲醇混合溶剂作为洗脱液), 收集分离得到的黄色组分并蒸干干燥, 最终得黄色固体粉末, 即为化合物 L, 粗收率约为 4.2%。

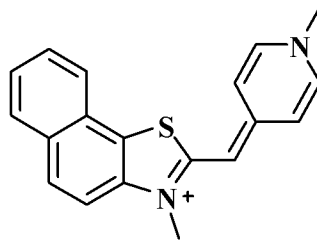
对化合物 L 进行核磁共振测试, 结果如下。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO): δ 8.26 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.50 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.36 (t, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 6.21 (s, 1H), 3.97 (s, 2H), 3.71 (s, 2H), 2.39 (s, 1H)。

经验证, 测试结果符合化学式 XII 的结构。

实施例 13

制备具有化学式 XIII 所示的结构化合物 M,



化学式 XIII

在本实施方式中, X 为 S, R_1 为苯基, R_2 为 H, R_3 为甲基, R_4 为甲基。

化合物 M 的具体制备方法如下:

第一步: 在 25mL 容量的圆底烧瓶中装入 5mL 四氢呋喃, 之后加入 4.88mmol 的 4-碘吡啶和 9.76mmol 的碘甲烷, 在 75°C 和回流的条件下反应 3h。将反应得到的混合物用乙酸乙酯进行充分洗涤, 干燥后得到棕黄色固体粉末, 其为 4-碘-1-甲基吡啶季铵盐, 粗收率约为 93%。

第二步: 将 501.83mmol 的 2-甲基萘噻唑加入到 25mL 容量的双口圆底烧瓶中, 之后再加入 4mL 氯仿, 然后在搅拌的同时缓慢滴加 1.00mmol 的碘甲烷, 再 80°C 及回流的条件下反应 8h 左右。反应结束后将反应器冷却到室温, 在得到的混合物中加入乙醚进行静置沉淀并过滤, 使用大量乙醚洗涤滤饼。将滤出物干燥后得到黄色固体, 其为 2,3-二甲基萘噻唑, 粗收率约为 56.35%。

第三步: 在 25mL 的双口圆底烧瓶中装入 4mL 无水甲醇, 之后加入

466.62mmol 的上述第二步得到的 2,3-二甲基苯噻唑，再加入 559.95mmol NaHCO_3 (已溶于 2mL 水中)，在室温条件下搅拌 0.5h。之后再将 559.95mmol 的上述第一步得到的 4-碘-1-甲基吡啶加到反应器内，在 110℃ 温度下回流反应过夜。将得到的反应液用先水洗涤，之后用二氯甲烷萃取，然后干燥

5 浓缩，最后加入乙酸乙酯进行结晶并过滤。过滤得到的粗产品通过中性硅胶柱分离（二氯甲烷和甲醇混合溶剂作为洗脱液），收集分离后的黄色组分，将其蒸干干燥，最终得黄色固体粉末，即为化合物 M，粗收率约为 1.40%。

对化合物 M 进行核磁共振测试，结果如下。

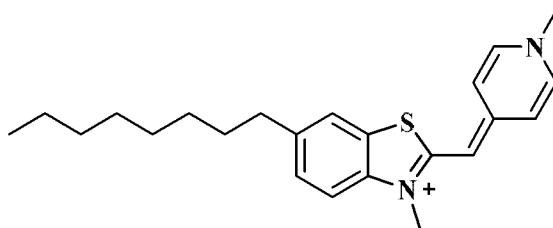
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO) : δ 8.30 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 1H), 8.13 (dd, $J=11.7, 8.6\text{Hz}$, 1H), 7.99 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.90 (d, $J=9.1\text{Hz}$, 1H), 7.73 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 7.59 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.49 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 6.34 (s, 1H), 4.00 (s, 1H), 3.86 (s, 1H)。

10

经验证，测试结果符合化学式 XIII 的结构。

实施例 14

15 制备具有化学式 XVIII 所示的结构化合物 N，



化学式 XVIII

化合物 N 的具体制备方法如下：第一步：在 25mL 容量的圆底烧瓶中装入 50mL，之后加入 50 mmol 的氢化钠和 46 mmol 的 2-巯基、6-壬烷苯并噻唑，在 75℃ 回流的条件下反应 3h。将反应得到的混合物用乙酸乙酯进行充分洗涤，干燥后得到淡黄色固体粉末，其为 2-巯甲基、6-壬烷苯并噻唑，粗收率约为 93%。

20

第二步：将 45 mmol 的 2-巯甲基、6-壬烷苯并噻唑加入到 25mL 容量的双口圆底烧瓶中，之后再加入 4mL 氯仿，然后在搅拌的同时缓慢滴加 1.00mmol 的碘甲烷，再 80℃ 及回流的条件下反应 8h 左右。反应结束后将反应器冷却到室温，在得到的混合物中加入乙醚进行静置沉淀并过滤，使用大量乙醚洗涤滤饼。将滤出物干燥后得到黄色固体，其为 1-甲基、2-巯甲基、6-壬烷苯并噻唑，粗收率约为 56.35%。

25

第三步：在 25mL 的双口圆底烧瓶中装入 4 mL 无水甲醇，之后加入

40 mmol 的上述第二步得到的 1-甲基、2-巯甲基、6-壬烷苯并噻唑，再加入 559.95mmol DIEA（已溶于 2mL 水中），在 80°C 条件下搅拌 0.5h。之后再 5 559.95mmol 的上述第一步得到的 4-碘-1-甲基吡啶加到反应器内，在 80°C 温度下回流反应过夜。将得到的反应液用先水洗涤，之后用二氯甲烷萃取，然后干燥浓缩，最后加入乙酸乙酯进行结晶并过滤。过滤得到的粗产品通过中性硅胶柱分离（二氯甲烷和甲醇混合溶剂作为洗脱液），收集分离后的黄色组分，将其蒸干干燥，最终得黄色固体粉末，即为化合物 M，粗收率约为 5.8%。

对化合物 M 进行核磁共振测试，结果如下。

10 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO) : δ 7.84 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 2H), 7.18 (dd, $J=11.7, 8.6\text{Hz}$, 2H), 7.2 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 7.75 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 7.63 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 4.39 (s, 3H), 3.58 (s, 3H) 1.60 (t, 14H), 1.26 (t, 3H)。

经验证，测试结果符合化学式 XVIII 的结构。

15

使用实施例 1-14 中合成的化合物对小牛胸腺 DNA 及 RNA 进行染色，并使用紫外可见分光光度计以及荧光分光光度计分别测试吸收光(激发光) 1 谱和荧光（发射光）光谱。结果为实施例 1-14 中合成的化合物的激发光波长在蓝绿色区间。

20 使用实施例 1-14 中合成的化合物对 HeLa 活细胞进行染色，并使用共聚焦激光扫描显微镜观察观察。结果显示实施例 1-14 中合成的化合物均能在不破坏细胞膜的情况下对 HeLa 细胞染色，成像清晰。

下面将以实施例 2 合成的化合物 B、实施例 3 合成的化合物 C 和实施例 13 合成的化合物 M 为例，对小牛胸腺核酸染色实验以及 HeLa 活细胞 25 染色实验进行详细说明。

实施例 15

化合物 B 对小牛胸腺 DNA 的染色实验：

配置浓度分别为 10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、60 $\mu\text{g/mL}$ 、70 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、90 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、110 $\mu\text{g/mL}$ 、120 $\mu\text{g/mL}$ 、30 130 $\mu\text{g/mL}$ 、140 $\mu\text{g/mL}$ 、150 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 的小牛胸腺 DNA 的水溶液。

将一定量的化合物 B 溶解在 DMSO（二甲基亚砜）中，并向其中加入 pH 为 7.4 且浓度为 10mmol/L 的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐缓冲液，配制

出具有一定浓度的化合物 B 的缓冲溶液。

将一定量的化合物 B 的缓冲溶液与一定量的上述不同浓度的小牛胸腺 DNA 的水溶液混合，放置在比色皿中并在 37℃ 环境中静置 3min 后，测定其吸收光谱。并以一定量的化合物 B 的缓冲溶液与一定量的水作为对比试

5 验。所用仪器为紫外可见分光光度计，型号为 Hp8453。

化合物 B 随 DNA 浓度变化的吸收光谱如图 1 所示。在图中，以 440nm 处为例，沿纵坐标自上而下的不同曲线所代表的核酸浓度依次增加。其中，最高处的曲线代表 0μg/mL，即无 DNA；最低处的曲线代表 200μg/mL 的核酸浓度。从图中可以看出，化合物 B 对波长 440nm 左右的光的吸收最强，

10 此波长附近的光是蓝绿色光。

取每个浓度的小牛胸腺 DNA 溶液的吸收曲线的最大吸收峰处（如 440nm 附近）的波长，以该波长的光为激发光，对上述不同浓度的小牛胸腺 DNA 溶液与化合物 B 的混合溶液进行荧光激发实验，测定荧光光谱。所用仪器为荧光分光光度计，型号为 FP-6500。

15 化合物 B 随 DNA 浓度变化的荧光光谱如图 2 所示。在图中，以 475nm 处为例，沿纵坐标自上而下的不同曲线所代表的核酸浓度依次降低。其中，最高处的曲线代表 200μg/mL 的 DNA 浓度；最低处的曲线代（几乎与横轴重叠）表 0μg/mL，即无 DNA。从图中可以看出，受激发后的化合物 B 发出的荧光在 485nm 附近的强度最大，说明化合物 B 能够成功的发射荧光，

20 能够作为荧光染料使用。

化合物 B 对小牛胸腺 RNA 的染色实验与上述 DNA 染色实验过程相类似，在次不再赘述。化合物 B 随小牛胸腺 RNA 浓度变化的吸收光谱如图 3 所示，化合物 B 随小牛胸腺 RNA 浓度变化的荧光光谱如图 4 所示。

25 在图 3 中，以 440nm 处为例，沿纵坐标自上而下的不同曲线所代表的核酸浓度依次增加。其中，最高处的曲线代表 0μg/mL，即无 RNA；最低处的曲线代表 200μg/mL 的 RNA 浓度。从图中可以看出，化合物 B 对波长 440nm 左右的光的吸收最强，此波长附近的光是蓝绿色光。

30 在图 4 中，以 475nm 处为例，沿纵坐标自上而下的不同曲线所代表的核酸浓度依次降低。其中，最高处的曲线代表 200μg/mL 的 RNA 浓度；最低处的曲线代（几乎与横轴重叠）表 0μg/mL，即无 RNA。从图中可以看出，受激发后的化合物 B 发出的荧光在 485nm 附近的强度最大，说明化合物 B 能够成功的发射荧光，能够作为荧光染料使用。

由此可见，化合物 B 对波长较短的蓝绿色激光的吸收良好，波长较短有利于对微小颗粒物体的识别，能够使用普通半导体绿色激光器或蓝色激光器作为光源，成本较低。

图 5 示出了化合物 B 对 DNA 和 RNA 染色后的荧光强度随核酸浓度变化的曲线。在图中，更加清楚地示出了随着核酸浓度的增加，化合物 B 的荧光强度越高。在无核酸时化合物 B 受激发几乎不发光，这有利于减弱本底荧光的背景干扰，能够提高灵敏度。

实施例 16

化合物 B 对 HeLa 活细胞的染色试验。所用仪器为共聚焦激光扫描显微镜，型号为 FV1000IX81, Japan。

将化合物 B 加入 PBS 缓冲液中，配制出浓度为 1mmol/L 的化合物 B 缓冲溶液。在六孔板中培养好 HeLa 细胞，在其中加入 10 μ L 上述化合物 B 缓冲溶液。之后在条件为 37 $^{\circ}$ C 以及 CO₂ 含量 5% 的细胞培养箱中孵育 30min。

孵育结束后，使用 PBS 震荡清洗 3 次，再加入细胞培养基，使用共聚焦激光扫描显微镜观察细胞形态。观察结果如图 6 所示的代表性区域的明场显微照片，从图中能够清晰的看到形态完整的活细胞。

对上述代表性区域使用 488nm 通道激发，用 100 倍油镜观察，重复三次。结果如图 7 所示的化合物 B 对 HeLa 活细胞染色的荧光显微照片。从图中，能够清楚地看到每个细胞中均能够发出荧光。

图 8 为图 6 的明场显微照片与图 7 的荧光显微照片的叠加照片。在图中，能够更加清楚地看到细胞核被染色，并且细胞结构完整。

由图 6-图 8 可知，化合物 B 能够有效穿透活细胞膜对核酸进行染色，并且不会破坏细胞结构，这样就能够在细胞存活状态下进行染色观察，更加有利于对细胞的形态、种类等进行识别。

实施例 17

化合物 C 对小牛胸腺 DNA 及 RNA 的染色实验，试验过程与实施例 10 中的方案相类似，区别仅在于不配置 200 μ g/mL 浓度的核酸溶液。具体过程在此不再赘述。

图 9 示出了化合物 C 随小牛胸腺 DNA 浓度变化的荧光光谱。在图中，以 475nm 处为例，沿纵坐标自上而下的不同曲线所代表的核酸浓度依次降低。其中，最高处的曲线代表 200 μ g/mL 的 DNA 浓度；最低处的曲线代（几乎与横轴重叠）表 0 μ g/mL，即无 DNA。从图中可以看出，受激发后的化

合物 C 发出的荧光在 485nm 附近的强度最大, 说明化合物 C 能够成功的发射荧光, 能够作为荧光染料使用。

图 10 示出了化合物 C 随小牛胸腺 RNA 浓度变化的荧光光谱。在图中, 以 475nm 处为例, 沿纵坐标自上而下的不同曲线所代表的核酸浓度依次降低。其中, 最高处的曲线代表 200 μ g/mL 的 RNA 浓度; 最低处的曲线代(几乎与横轴重叠)表 0 μ g/mL, 即无 RNA。从图中可以看出, 受激发后的化合物 C 发出的荧光在 485nm 附近的强度最大, 说明化合物 C 能够成功的发射荧光, 能够作为荧光染料使用。

图 11 示出了化合物 C 对 DNA 和 RNA 染色后的荧光强度随核酸浓度变化的曲线。在图中, 更加清楚地示出了随着核酸浓度的增加, 化合物 C 的荧光强度越高。

实施例 18

化合物 C 对 HeLa 活细胞的染色试验。所用仪器为共聚焦激光扫描显微镜, 型号为 FV1000IX81, Japan。实验过程与实施例 15 相类似, 在此不再赘述。

图 12 示出了化合物 C 对 HeLa 活细胞的染色的代表性区域的明场显微照片, 从图中能够清晰的看到形态完整的活细胞, 并且细胞结构完整未被破坏。

图 13 示出了, 化合物 C 对 HeLa 活细胞的染色的代表性区域的荧光显微照片。从图中, 能够清楚地看到每个细胞中均能够发出荧光, 证明 HeLa 已被成功染色, 且识别度高。

实施例 19

化合物 M 对小牛胸腺 DNA 及 RNA 的染色实验, 试验过程与实施例 10 中的方案相类似, 区别仅在于不配置 200 μ g/mL 浓度的核酸溶液。具体过程在此不再赘述。

图 14 示出了化合物 M 随小牛胸腺 DNA 浓度变化的荧光光谱。在图中, 以 475nm 处为例, 沿纵坐标自上而下的不同曲线所代表的核酸浓度依次降低。其中, 最高处的曲线代表 200 μ g/mL 的 DNA 浓度; 最低处的曲线代(几乎与横轴重叠)表 0 μ g/mL, 即无 DNA。从图中可以看出, 受激发后的化合物 M 发出的荧光在 520 nm 附近的强度最大, 说明化合物 M 能够成功的发射荧光, 能够作为荧光染料使用。

图 15 示出了化合物 M 随小牛胸腺 RNA 浓度变化的荧光光谱。在图中,

以 475nm 处为例，沿纵坐标自上而下的不同曲线所代表的核酸浓度依次降低。其中，最高处的曲线代表 200 μ g/mL 的 RNA 浓度；最低处的曲线代（几乎与横轴重叠）表 0 μ g/mL，即无 RNA。从图中可以看出，受激发后的化合物 M 发出的荧光在 520 nm 附近的强度最大，说明化合物 M 能够成功的发射荧光，能够作为荧光染料使用。

图 16 示出了化合物 M 对 DNA 和 RNA 染色后的荧光强度随核酸浓度变化的曲线。在图中，更加清楚地示出了随着核酸浓度的增加，化合物 M 的荧光强度越高。

实施例 20

化合物 M 对 HeLa 活细胞的染色试验。所用仪器为共聚焦激光扫描显微镜，型号为 FV1000IX81，Japan。实验过程与实施例 15 相类似，在此不再赘述。

图 17 示出了化合物 M 对 HeLa 活细胞的染色的代表性区域的明场显微照片，从图中能够清晰的看到形态完整的活细胞，并且细胞结构完整未被破坏。

图 18 示出了化合物 M 对 HeLa 活细胞的染色的代表性区域的荧光显微照片。从图中，能够清楚地看到每个细胞中均能够发出荧光，证明 HeLa 已被成功染色，且识别度高。

实施例 21

为了研究 R1 为苯基对核酸荧光响应的影响，向同浓度化合物 B 和化合物 N 中分别加入了 0、10、20、30 和 40 微克\毫升的 DNA，检测加入体系的荧光强度。结果如图 19 所示，化合物 N 荧光强度显著高于化合物 B，该结果表明 R1 为苯基显著地增强了化合物对核酸的响应性，使其更适用于核酸生物染色。其它 R1 为苯基的化合物相比于 R1 为氢的化合物也呈现出类似的结果，具有更高的核酸荧光响应性能。

综上所述，本发明的实施例 1 到实施例 14 的化合物均能穿透活细胞膜，且不破坏原有细胞结构，能够对核酸有效染色；并且吸收光的波长范围均位于蓝绿光区，能够使用蓝色或绿色激光器，使用成本低。

表 1

编号	化合物	吸收光颜色	能否穿透活细胞膜	是否破坏细胞结构
实施例 1	化合物 A	蓝绿光	能	否

实施例 2	化合物 B	蓝绿光	能	否
实施例 3	化合物 C	蓝绿光	能	否
实施例 4	化合物 D	蓝绿光	能	否
实施例 5	化合物 E	蓝绿光	能	否
实施例 6	化合物 F	蓝绿光	能	否
实施例 7	化合物 G	蓝绿光	能	否
实施例 8	化合物 H	蓝绿光	能	否
实施例 9	化合物 I	蓝绿光	能	否
实施例 10	化合物 J	蓝绿光	能	否
实施例 11	化合物 K	蓝绿光	能	否
实施例 12	化合物 L	蓝绿光	能	否
实施例 13	化合物 M	蓝绿光	能	否
实施例 14	化合物 N	蓝绿光	能	否

因此，本发明的菁类化合物能够作为染料使用，特别是作为荧光染料使用，正如本发明的第二方面所涉及的。

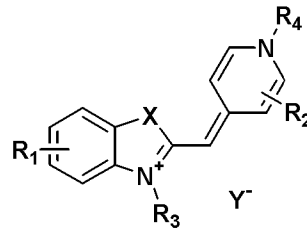
并且，包含本发明的菁类化合物的上述荧光染料，能够在定量检测核
5 酸和/或生物染色中进行应用。特别是能够在活细胞染色中应用。

除非另有定义，本文中所使用的技术和科学术语与本发明的技术领域
的技术人员通常理解的含义相同。本文中使用的术语只是为了描述具体的
实施目的，不是旨在限制本发明。本文中在一个实施方式中描述的特征可
以单独地或与其它特征结合地应用于另一个实施方式，除非该特征在该另
10 一个实施方式中不适用或是另有说明。

本发明已经通过上述实施例进行了说明，但应当理解的是，上述实施
例只是用于举例和说明的目的，而非意在将本发明限制于所描述的实施例
范围内。此外本领域技术人员可以理解的是，本发明并不局限于上述实施
例，根据本发明的教导还可以做出更多种的变型和修改，这些变型和修改
15 均落在本发明所要求保护的范围以内。本发明的保护范围由附属的权利要
求书及其等效范围所界定。

权利要求书

1、一种菁类化合物，其特征在于，具有通式 I 所示的结构，



通式 I

其中，X 选自由 $C(CH_3)_2$ 、O、S 和 Se 组成的组；

R_1 和 R_2 各自独立地选自由 H、 C_1 - C_{18} 烷基、苯基、 OR_6 和卤素组成的组；

10 R_3 和 R_4 各自独立地选自由 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 羧基、 C_1 - C_{18} 羟基、 C_1 - $C_{18}NR_5R_6$ 、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由 C_1 - C_{18} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 烷基氨基、 C_1 - C_6 酰氨基、卤素和 C_1 - C_6 卤代烷基组成的组；

R_5 和 R_6 各自独立地选自由 H 和 C_1 - C_{18} 烷基组成的组；

15 Y^- 为负离子。

2、根据权利要求 1 所述的菁类化合物，其特征在于，所述 X 选自由 $C(CH_3)_2$ 和 S 组成的组。

3、根据权利要求 1 所述的菁类化合物，其特征在于，所述 R_1 和所述 R_2 各自独立地选自由 H、 C_1 - C_{12} 烷基、苯基、 OR_6 和卤素组成的组。

20 4、根据权利要求 3 所述的菁类化合物，其特征在于，所述 R_1 和所述 R_2 各自独立地选自由 H、 C_1 - C_6 烷基、苯基、 OR_6 和卤素组成的组。

5、根据权利要求 4 所述的菁类化合物，其特征在于，所述 R_1 选自由 H、 C_1 - C_6 烷基、苯基和卤素组成的组。

6、根据权利要求 4 所述的菁类化合物，其特征在于，所述 R_2 为 H。

25 7、根据权利要求 1 所述的菁类化合物，其特征在于，所述 R_3 和所述 R_4 各自独立地选自由 C_1 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 羧基、 C_1 - C_{12} 羟基、 C_1 - $C_{12}NR_5R_6$ 、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由 C_1 - C_{12} 烷基、CN、COOH、 NH_2 、 NO_2 、OH、SH、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 烷基氨基、 C_1 - C_6 酰氨基、卤素和 C_1 - C_6 卤代烷基组成的组。

8、根据权利要求7所述的菁类化合物，其特征在于，所述R₃和所述R₄各自独立地选自由C₁-C₆烷基、C₁-C₆羧基、C₁-C₆羟基、C₁-C₆NR₅R₆、苄基和取代苄基组成的组，其中所述取代苄基的取代基选自由C₁-C₆烷基、CN、COOH、NH₂、NO₂、OH、SH、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆烷基氨基、C₁-C₆酰氨基、卤素和C₁-C₆卤代烷基组成的组。

9、根据权利要求8所述的菁类化合物，其特征在于，所述R₃选自由C₁-C₆烷基、C₁-C₆羟基、C₁-C₆羧基、C₁-C₆NR₅R₆和苄基组成的组。

10、根据权利要求8所述的菁类化合物，其特征在于，所述R₄选自由C₁-C₆烷基、C₁-C₆羟基、C₁-C₆羧基、和苄基组成的组。

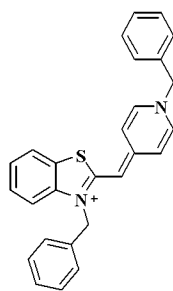
11、根据权利要求1所述的菁类化合物，其特征在于，所述R₅和所述R₆各自独立地选自由H和C₁-C₁₂烷基组成的组。

12、根据权利要求11所述的菁类化合物，其特征在于，所述R₅和所述R₆各自独立地选自由H和C₁-C₆烷基组成的组。

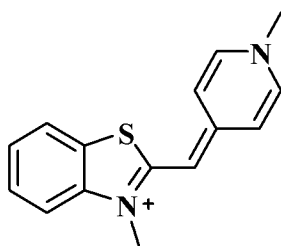
13、根据权利要求12所述的菁类化合物，其特征在于，所述R₅和所述R₆各自独立地为C₁-C₆烷基。

14、根据权利要求1所述的菁类化合物，其特征在于，所述Y选自由卤素负离子、ClO₄⁻、PF₆⁻、BF₄⁻、CH₃COO⁻或OTs⁻组成的组。

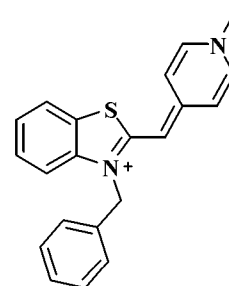
15、根据权利要求1所述的菁类化合物，其特征在于，所述菁类化合物包含化学式I、化学式II、化学式III、化学式IV、化学式V、化学式VI、化学式VII、化学式VIII、化学式IX、化学式X、化学式XI、化学式XII、化学式XIII、化学式XIV、化学式XV、化学式XVI、化学式XVII和化学式XVIII中的一种所示的结构，



化学式 I

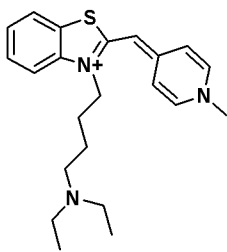


化学式 II

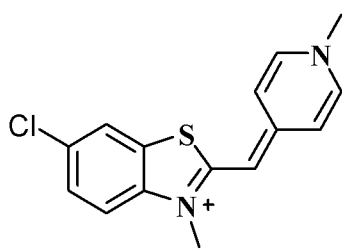


化学式 III

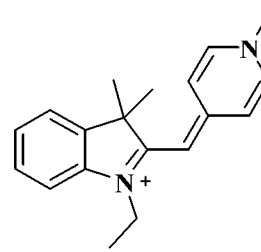
37



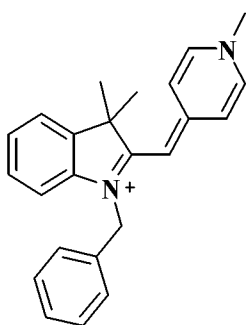
化学式 IV



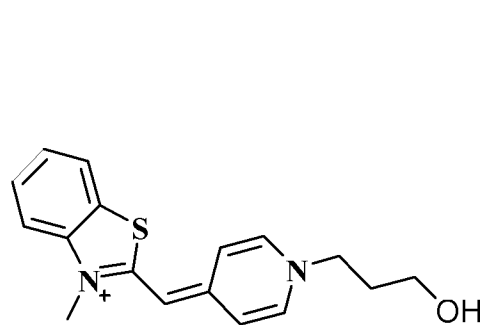
化学式 V



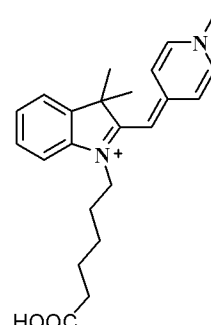
化学式 VI



化学式 VII

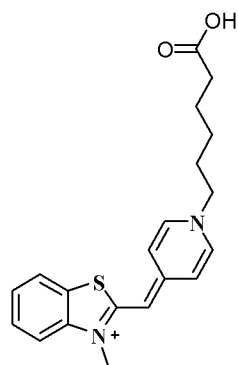


化学式 VIII

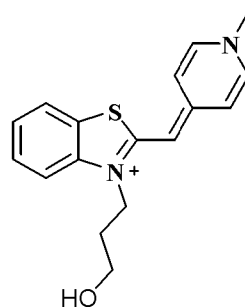


化学式 IX

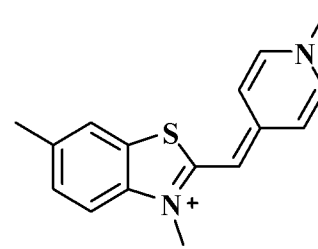
5



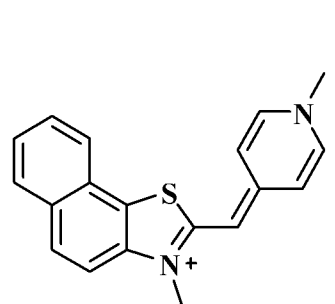
化学式 X



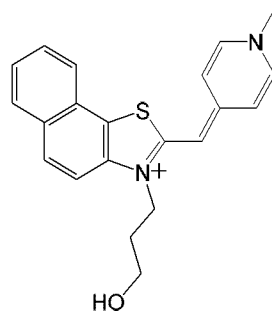
化学式 XI



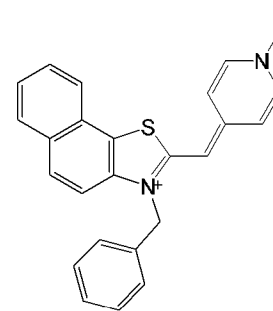
化学式 XII



化学式 XIII

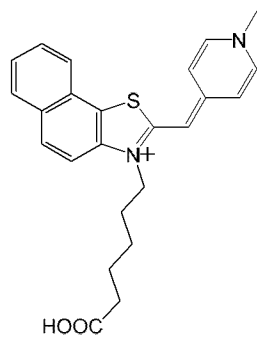


化学式 XIV

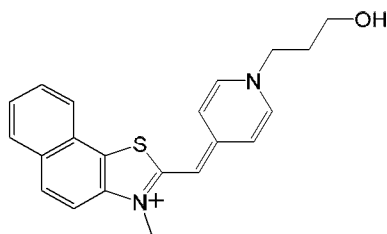


化学式 XV

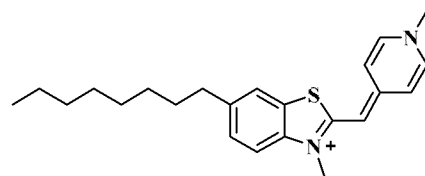
10



化学式 XVI



化学式 XVII



化学式 XVIII

16、一种染料，其特征在于，包括权利要求 1-15 中任意一项所述的菁
5 类化合物。

17、权利要求 1-15 中任意一项所述的菁类化合物在定量检测核酸、生
物染色、和/或血细胞分析中的应用。

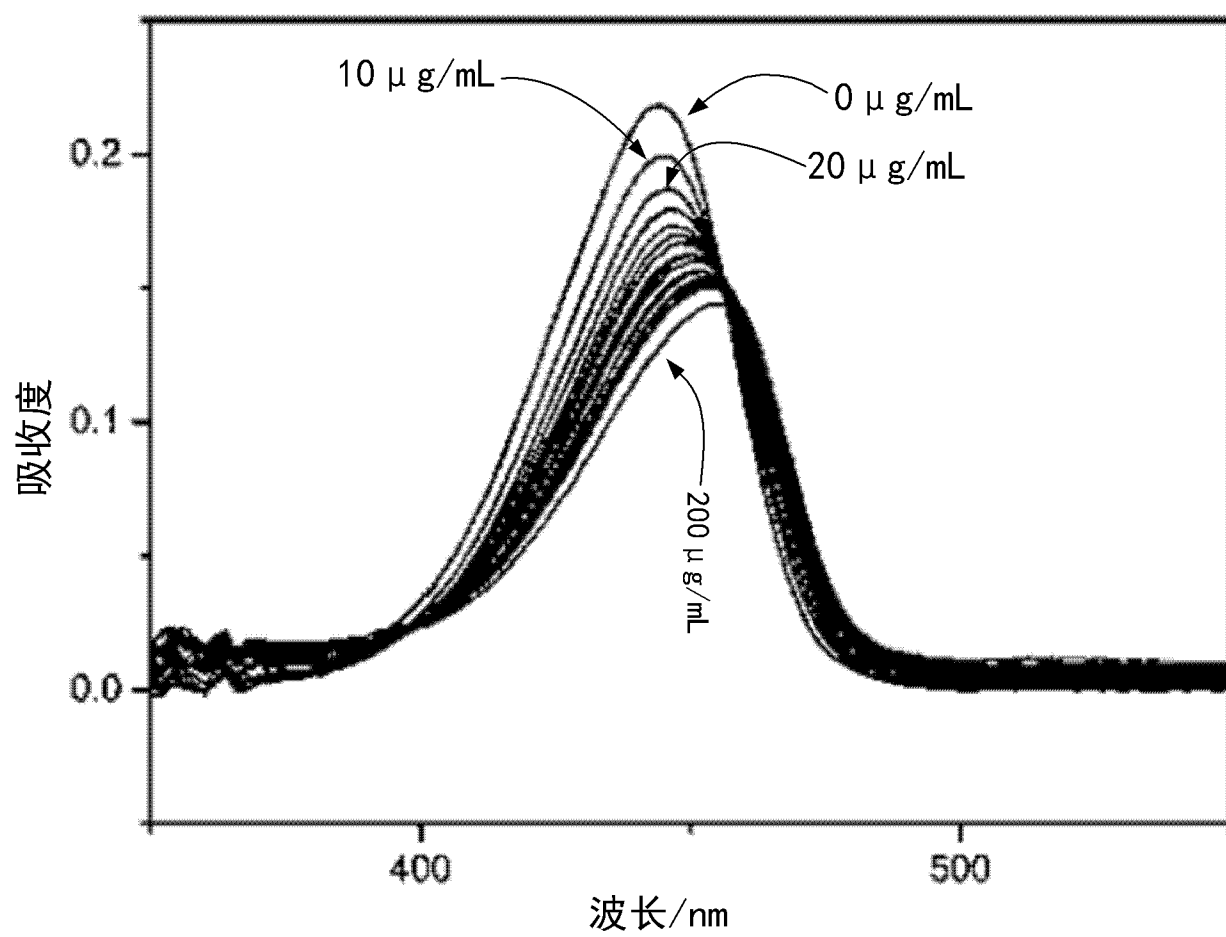


图 1

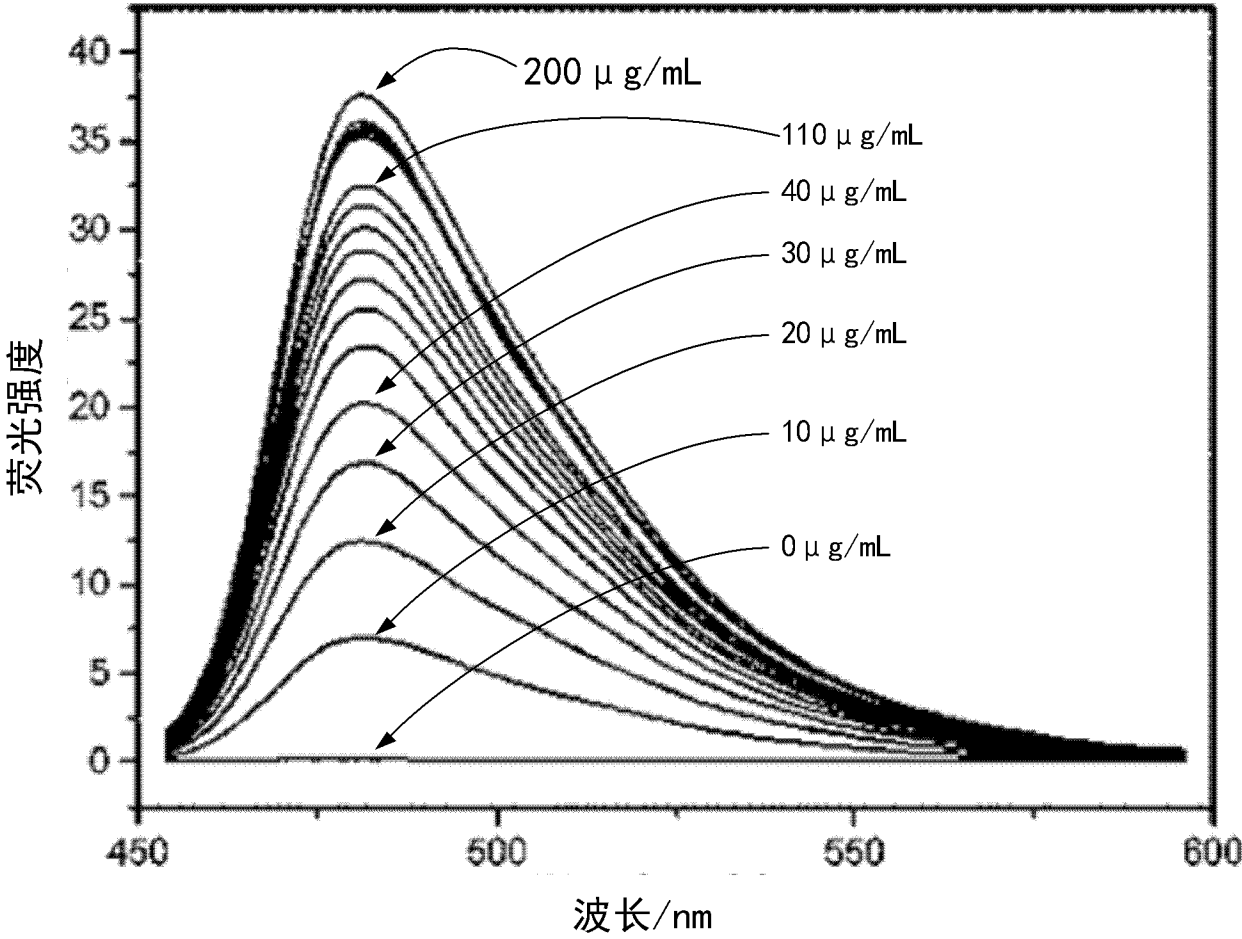


图 2

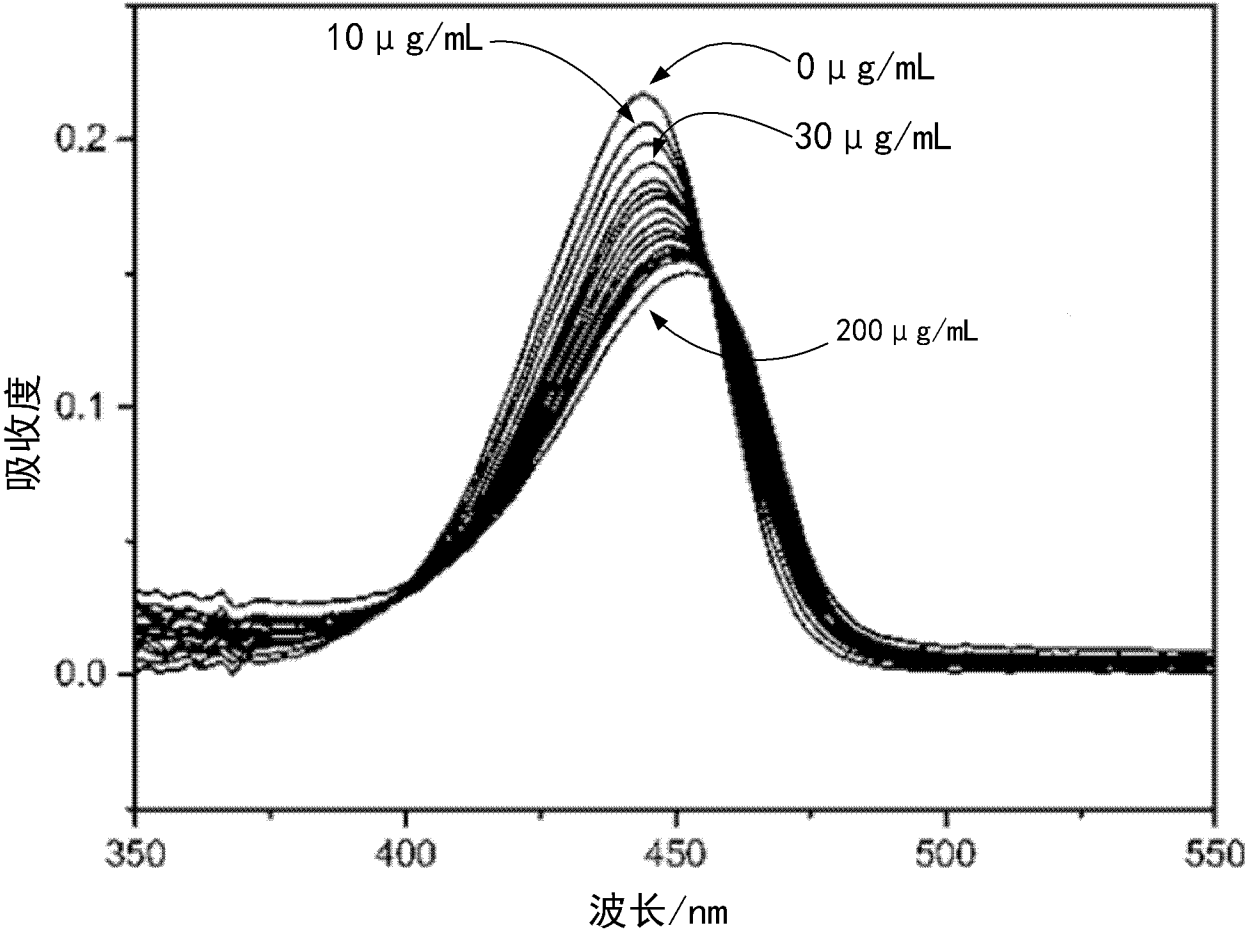


图 3

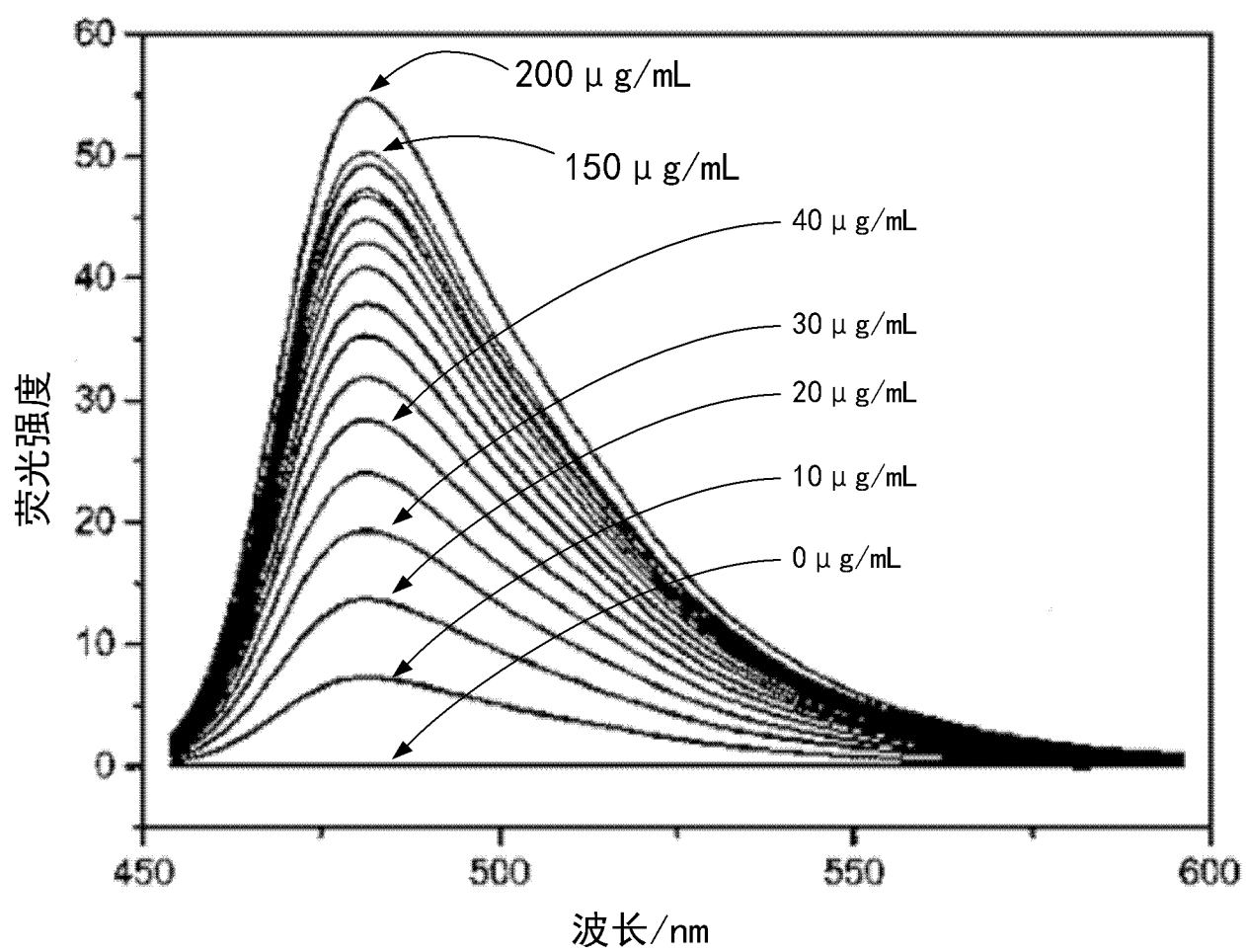


图 4

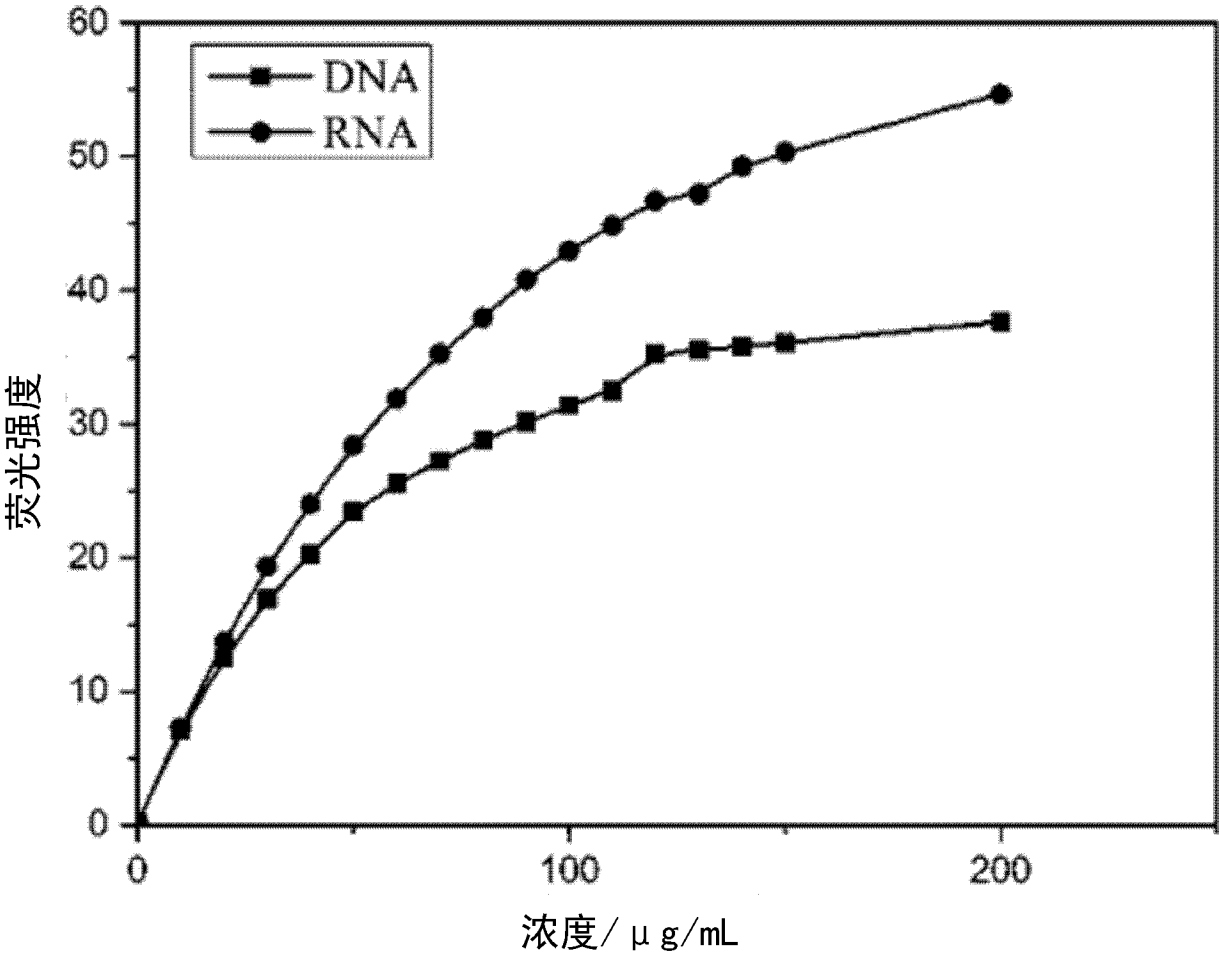


图 5

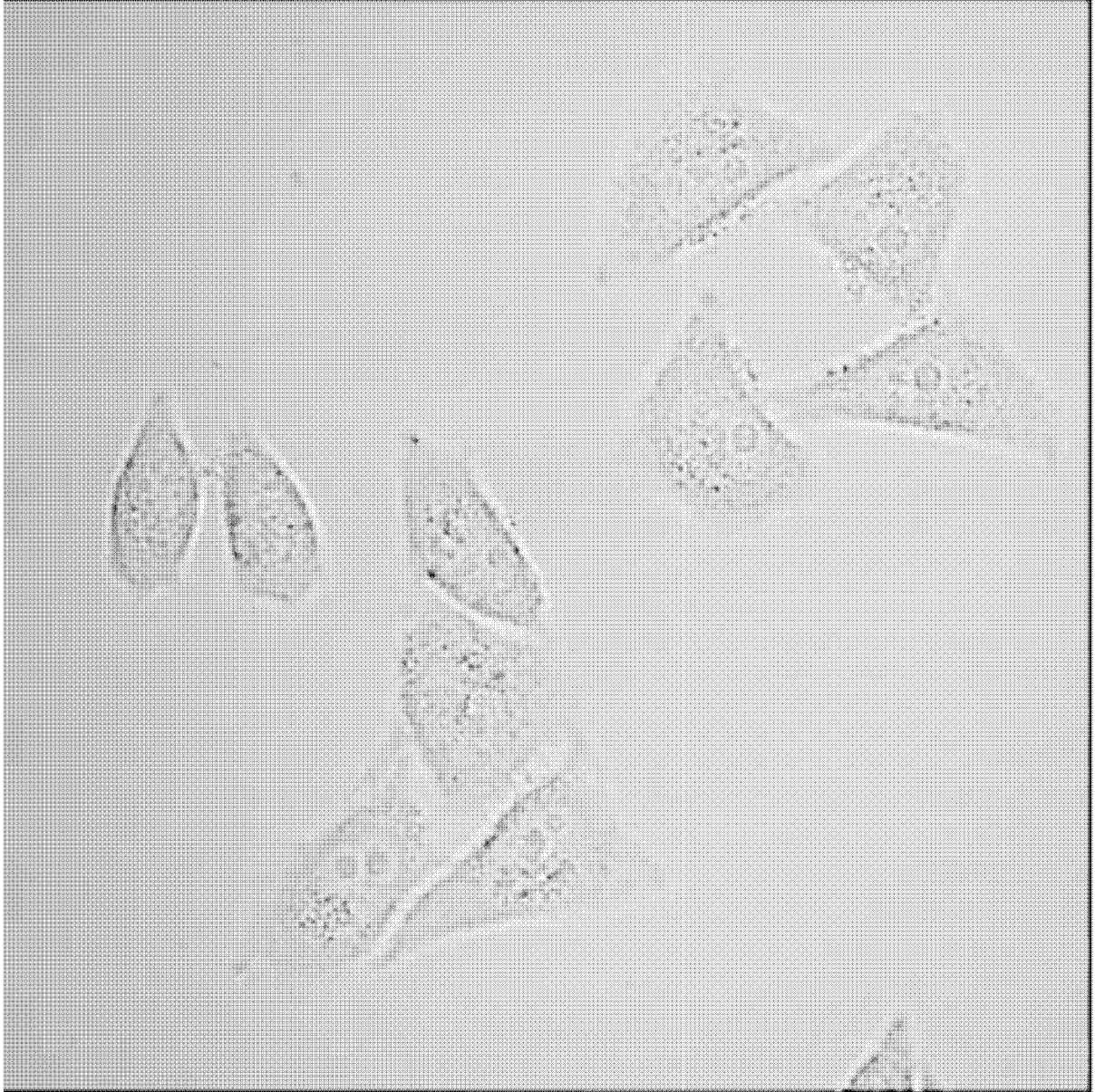


图 6

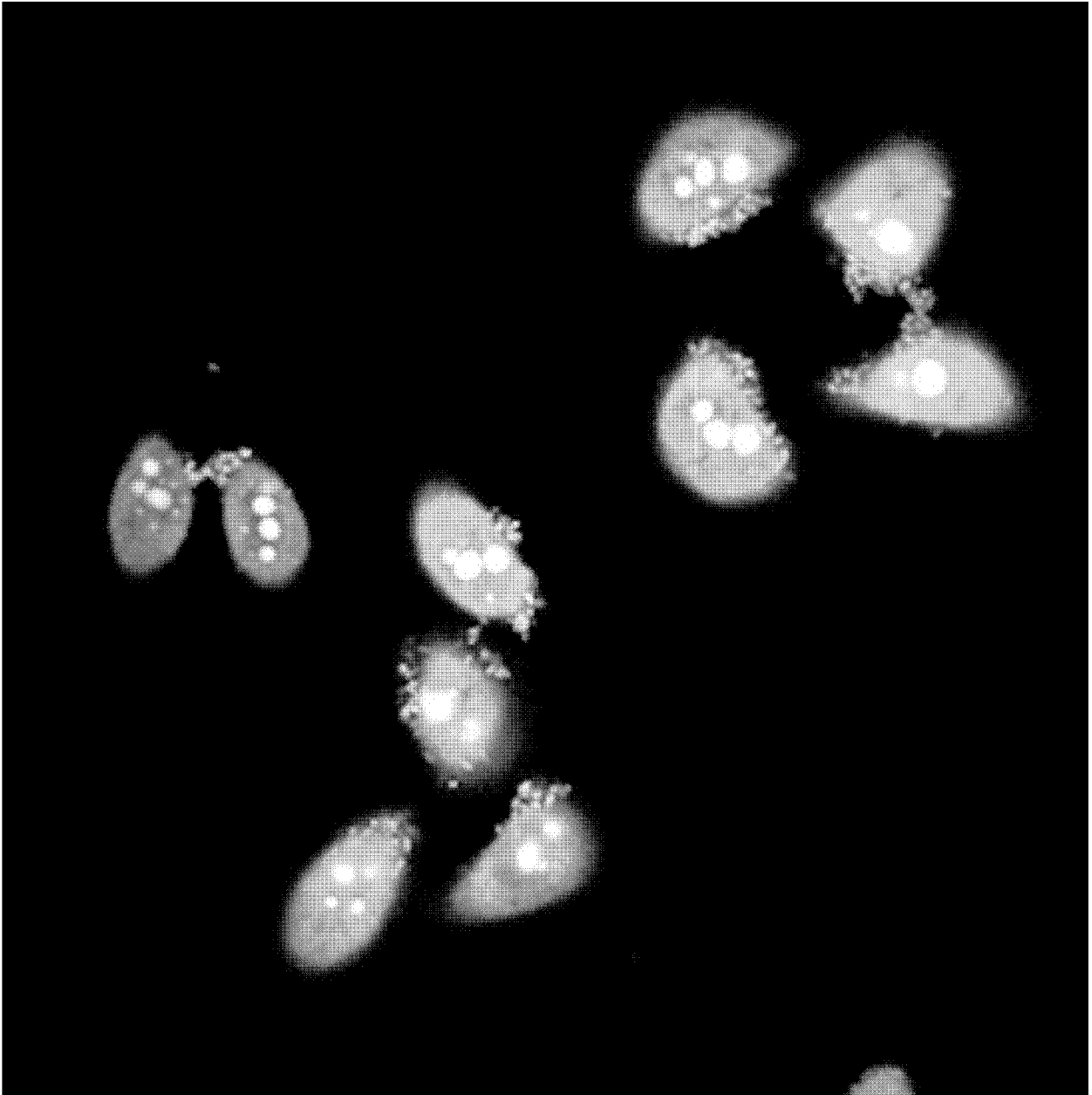


图 7

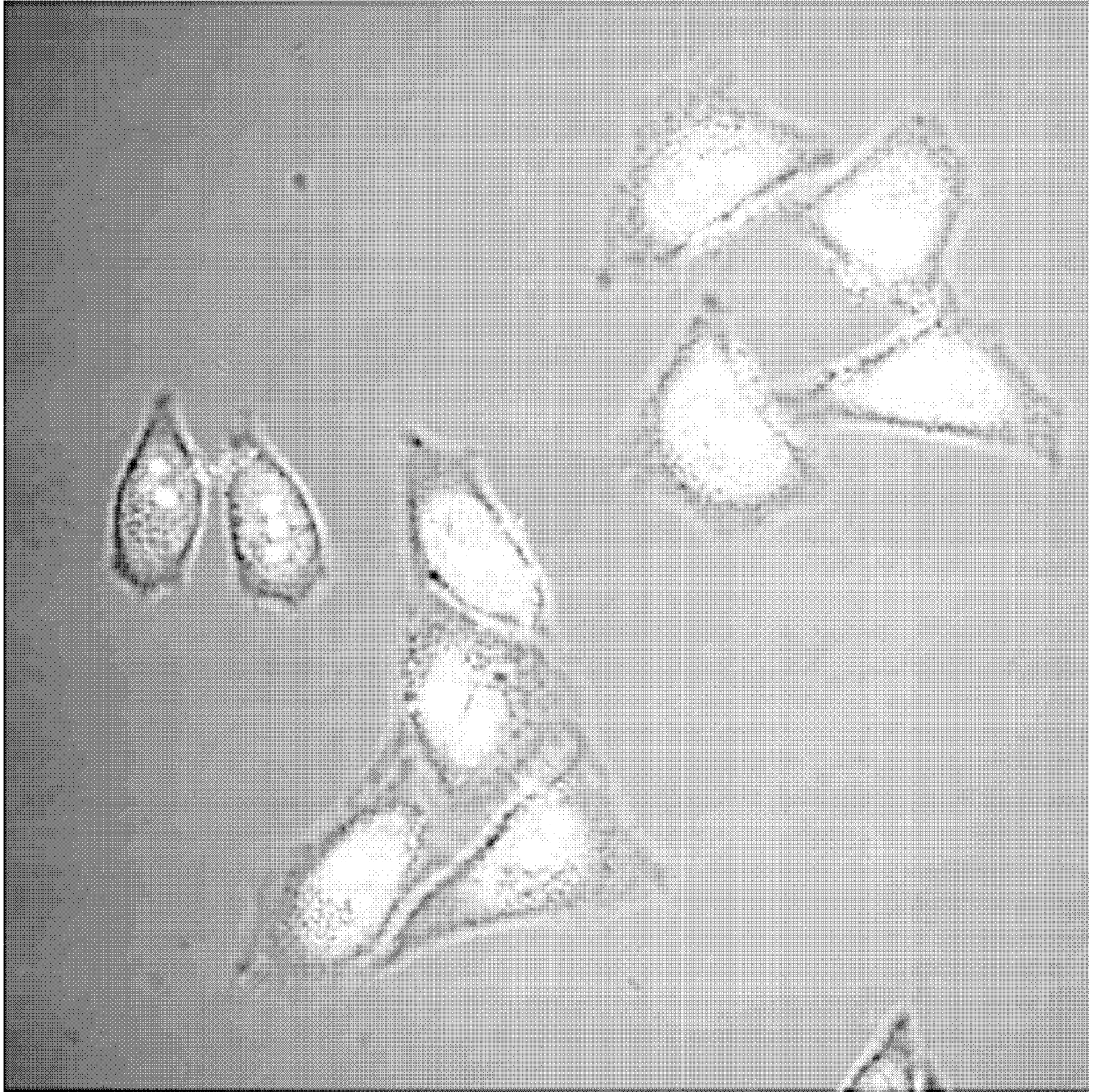


图 8

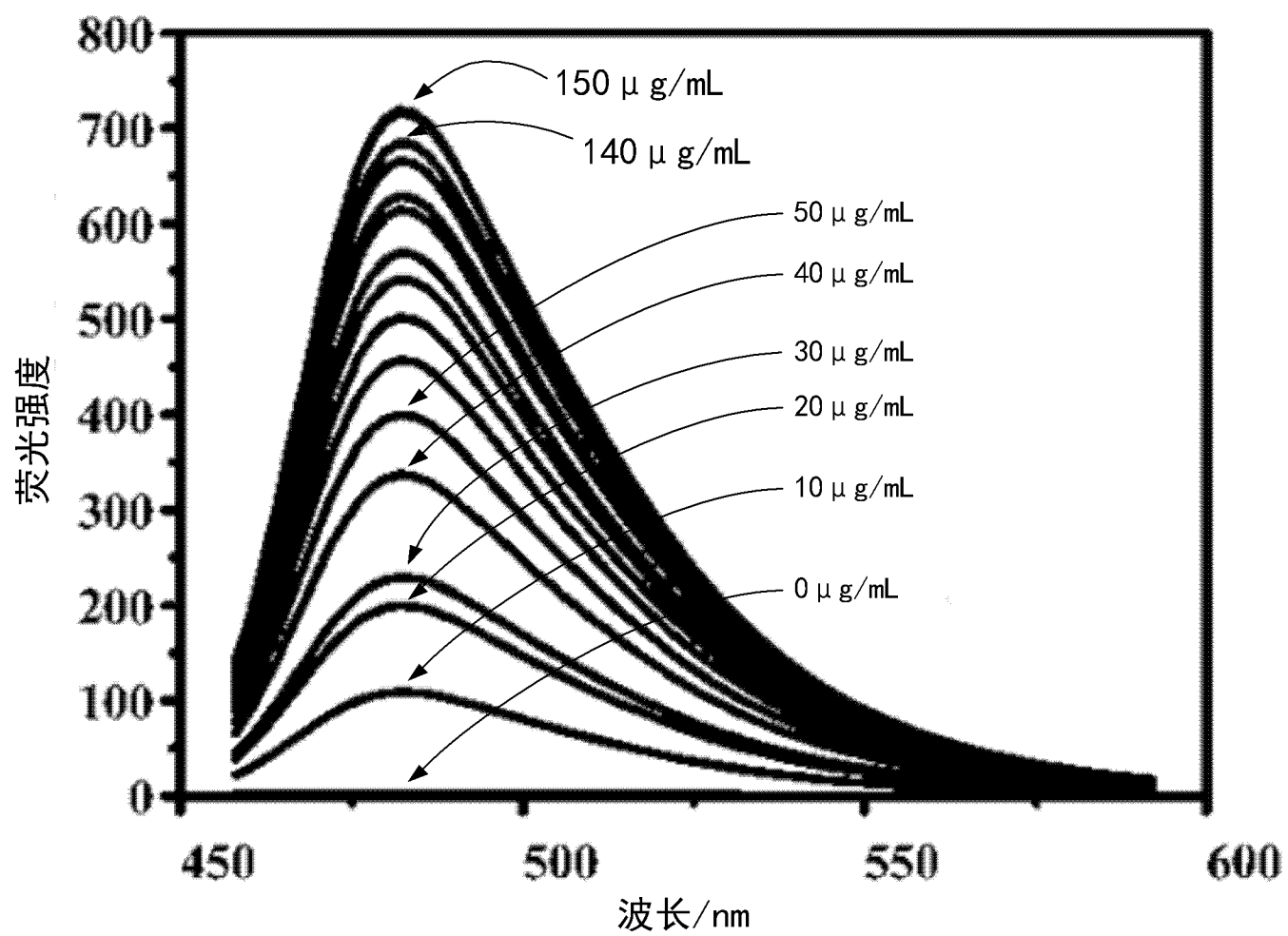


图 9

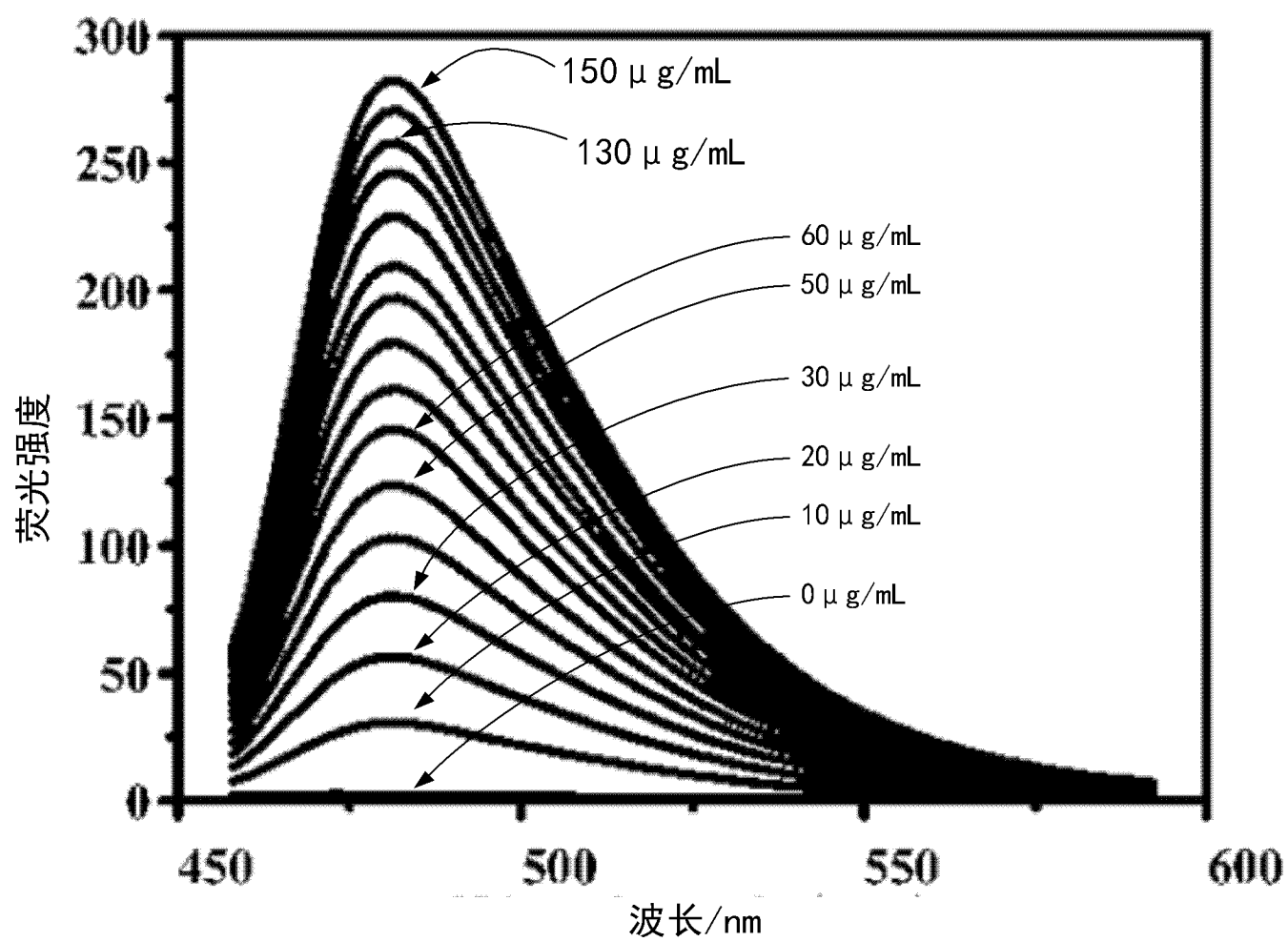


图 10

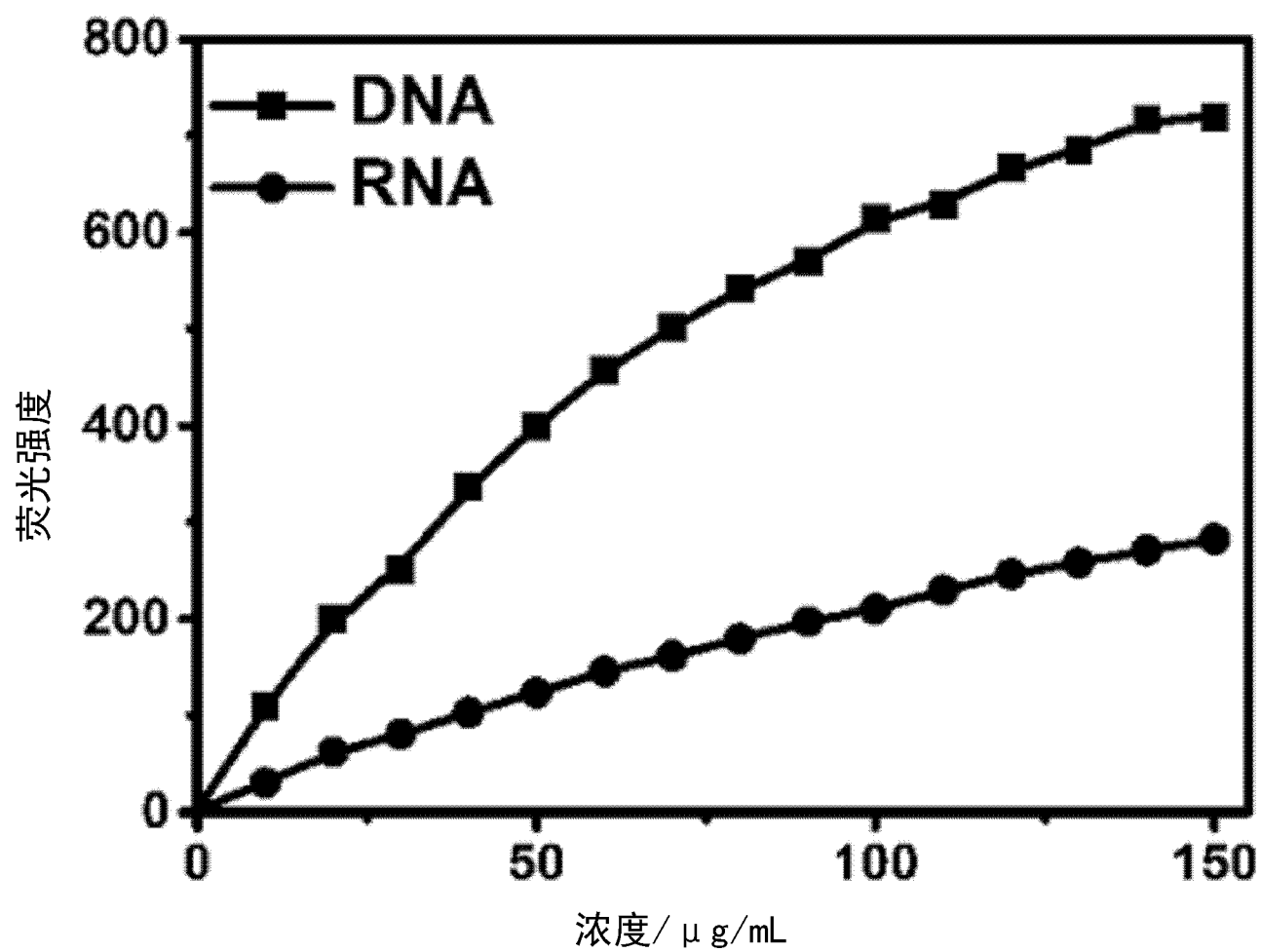


图 11

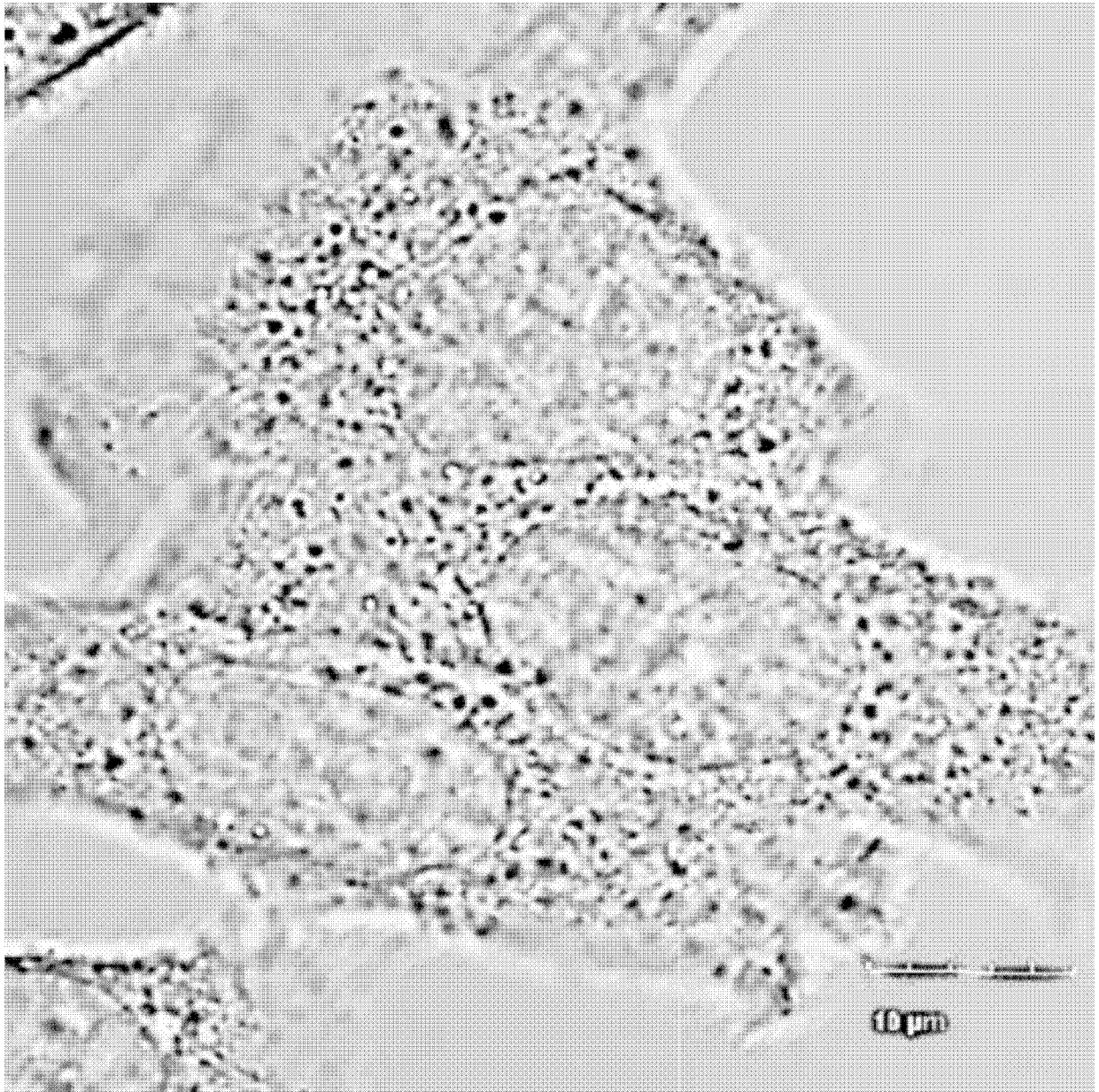


图 12

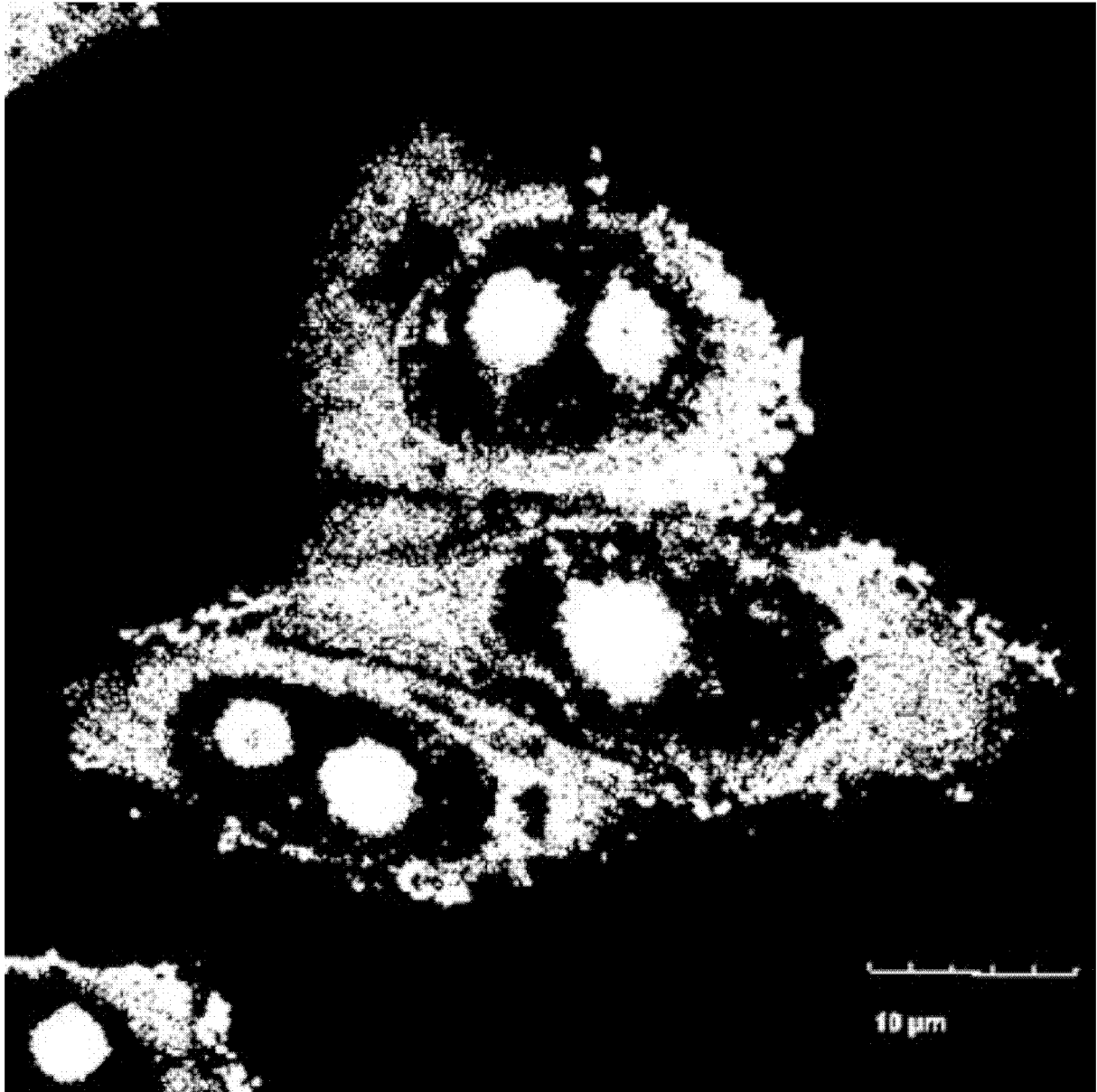


图 13

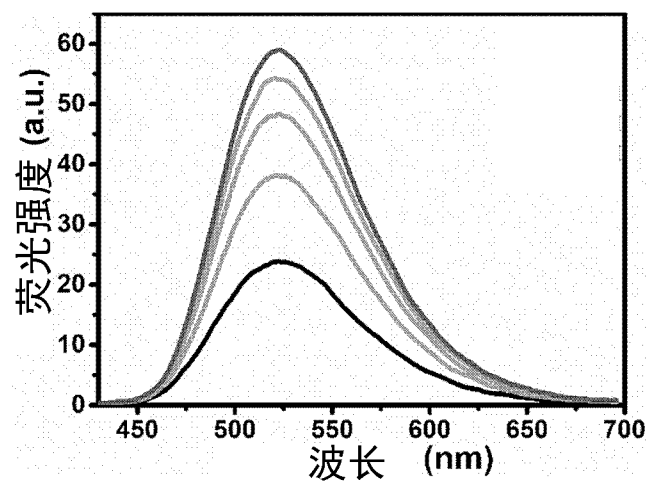


图 14

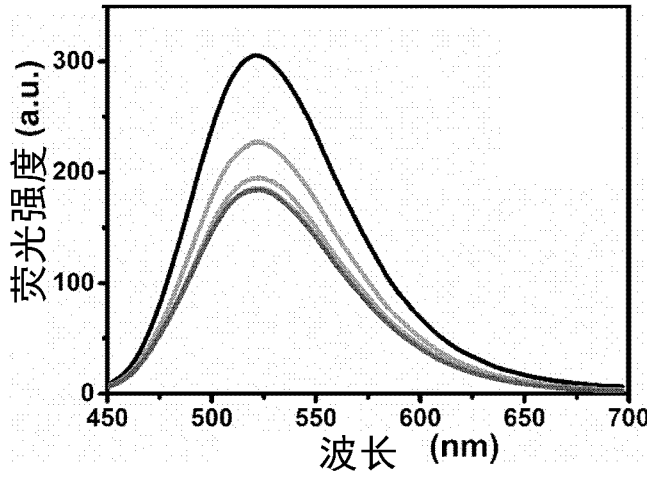


图 15

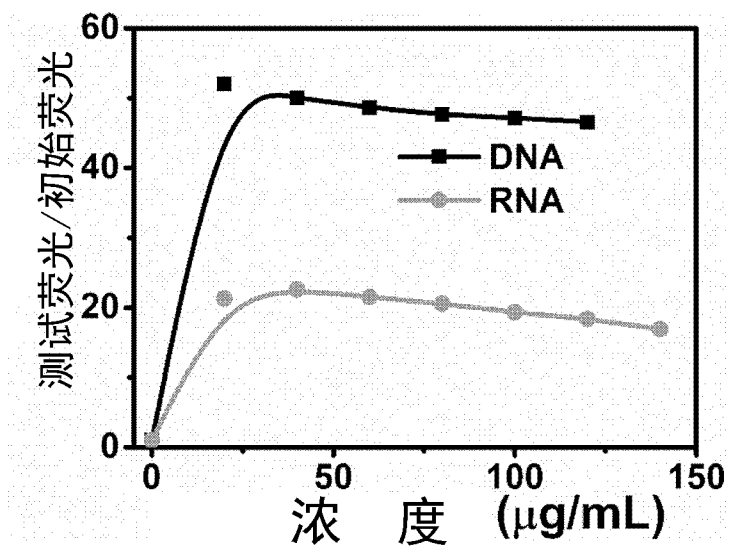


图 16

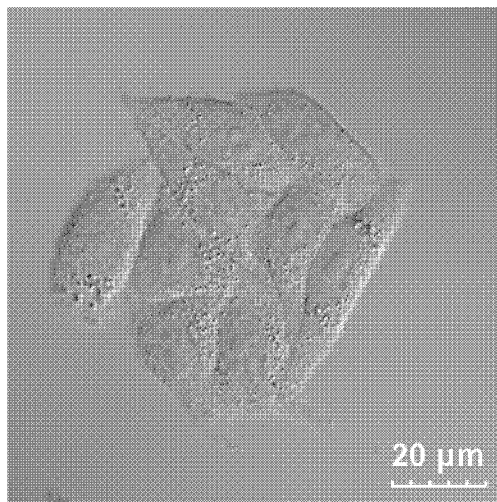


图 17

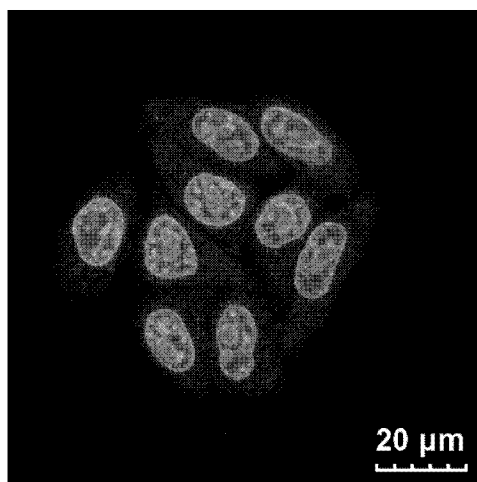


图 18

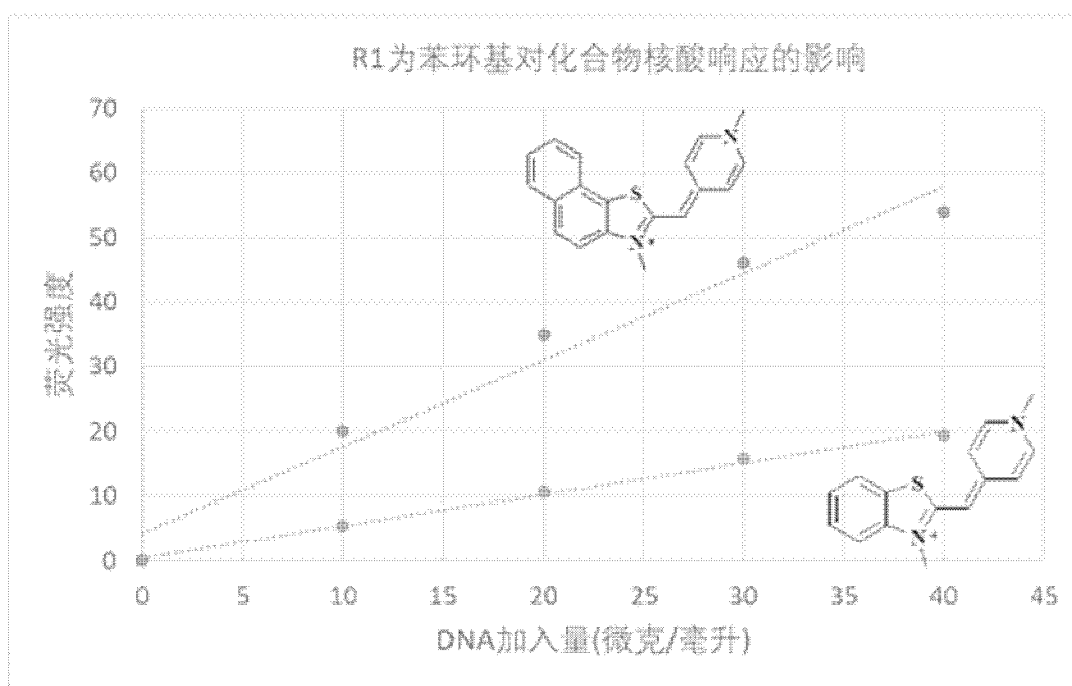


图 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/130477

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C09B 23/02(2006.01)i; C07D 417/06(2006.01)i; C07D 413/06(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C09B;C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNTXT; VEN; CNKI; STN-REG/CAP: 迈瑞, 菁, 大连理工大学, 樊江莉, 陈庚文, 夏天平, 染料, 染色, 荧光, 检测, 核酸, cyanine, dye, fluorescence, probe, stain, DNA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1226928 A (M. KUBISTA) 25 August 1999 (1999-08-25) BO-1-O/BO-10-O, description pages 7, 14-16, 22, figure 14	1-17
X	CN 102112875 A (SYSMEX CORPORATION) 29 June 2011 (2011-06-29) description page 5 compound 10, description paragraphs 27-48, claim 1	1-17
X	US 5658751 A (MOLECULAR PROBES INC) 19 August 1997 (1997-08-19) description column 53 embodiment 11, column 13 lines 30-55, column 14 lines 15, 30-45	1-17
X	LINDA G. Lee et al. "Thiazole Orange: A New Dye for Reticulocyte Analysis" <i>cytometry</i> , Vol. 7, No. 6, 01 November 1986 (1986-11-01), pp. 508-517	1-17
X	THOMAS L. Netzel et al. "Base-Content dependence of emission enhancements, quantum yields, and lifetimes for cyanine dyes bound to double-strand dna: photophysical properties of monomeric and bichromophoric dna stains" <i>J. Phys. Chem.</i> , Vol. 99, No. 51, 15 November 1995 (1995-11-15), pp. 17936-17947	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 January 2022

Date of mailing of the international search report

08 February 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/130477

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tarita Biver et al. "Influence of cyanine dye structure on self-aggregation and interaction with nucleic acids: A kinetic approach to TO and BO binding" <i>Archives of Biochemistry and Biophysics</i> , Vol. 465, No. 1, 15 May 2007 (2007-05-15), pp. 90-100	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/130477

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	1226928	A	25 August 1999	WO	9745539	A1	04 December 1997
				US	6329144	B1	11 December 2001
				CA	2256545	A1	04 December 1997
				CA	2256545	C	31 October 2006
				CN	100398648	C	02 July 2008
				SE	9602183	D0	31 May 1996
				SE	9602183	L	01 December 1997
				SE	506700	C2	02 February 1998
				NZ	333473	A	28 October 1999
				EP	0918852	A1	02 June 1999
				JP	2005047901	A	24 February 2005
				RU	2223966	C2	20 February 2004
				PL	188875	B1	31 May 2005
				AU	3112997	A	05 January 1998
				JP	2000511057	A	29 August 2000
				EP	1357185	A1	29 October 2003
				BR	9709495	A	10 August 1999
CN	102112875	A	29 June 2011	US	2011124005	A1	26 May 2011
				JP	WO2010013678	A1	12 January 2012
				WO	2010013678	A1	04 February 2010
				KR	20110049830	A	12 May 2011
				EP	2320230	A1	11 May 2011
				AU	2009277638	A1	04 February 2010
US	5658751	A	19 August 1997	CA	2179284	A1	09 May 1996
				CA	2179284	C	04 April 2006
				AU	1999039672	A1	20 January 2000
				EP	0740689	A1	06 November 1996
				EP	0740689	B1	30 January 2002
				US	5863753	A	26 January 1999
				DE	69525239	D1	14 March 2002
				DE	69525239	T2	27 June 2002
				JP	2009280820	A	03 December 2009
				JP	4634514	B2	23 February 2011
				WO	9613552	A2	09 May 1996
				WO	9613552	A3	11 July 1996
				JP	2007291403	A	08 November 2007
				JP	4503047	B2	14 July 2010
				AT	212653	T	15 February 2002
				AU	3967295	A	23 May 1996
				AU	714890	B2	13 January 2000
				JP	H09507879	A	12 August 1997

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/130477

A. 主题的分类 C09B 23/02 (2006.01) i; C07D 417/06 (2006.01) i; C07D 413/06 (2006.01) i 按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类																				
B. 检索领域 检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号) C09B; C07D 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用)) CNTXT; VEN; CNKI; STN-REG/CAP: 迈瑞, 菁, 大连理工大学, 樊江莉, 陈庚文, 夏天平, 染料, 染色, 荧光, 检测, 核酸, cyanine, dye, fluorescence, probe, stain, DNA																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 1226928 A (米凯尔 库比斯塔) 1999年8月25日 (1999 - 08 - 25) B0-1-0/B0-10-0, 说明书第7, 14-16, 22页, 附图14</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 102112875 A (希森美康株式会社) 2011年6月29日 (2011 - 06 - 29) 说明书第5页化合物10, 说明书第27-48段, 权利要求1</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 5658751 A (MOLECULAR PROBES INC) 1997年8月19日 (1997 - 08 - 19) 说明书第53栏实施例11, 第13栏第30-55行, 第14栏第15, 30-45行</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>LINDA G. Lee等. "Thiazole Orange: A New Dye for Reticulocyte Analysis" cytometry, 第7卷, 第6期, 1986年11月1日 (1986 - 11 - 01), 第508-517页</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>THOMAS L. Netzel等. "Base-Content dependence of emission enhancements, quantum yields, and lifetimes for cyanine dyes bound to double-strand dna: photophysical properties of monomeric and bichromophoric dna stains" J. Phys. Chem., 第99卷, 第51期, 1995年11月15日 (1995 - 11 - 15), 第17936-17947页</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 1226928 A (米凯尔 库比斯塔) 1999年8月25日 (1999 - 08 - 25) B0-1-0/B0-10-0, 说明书第7, 14-16, 22页, 附图14	1-17	X	CN 102112875 A (希森美康株式会社) 2011年6月29日 (2011 - 06 - 29) 说明书第5页化合物10, 说明书第27-48段, 权利要求1	1-17	X	US 5658751 A (MOLECULAR PROBES INC) 1997年8月19日 (1997 - 08 - 19) 说明书第53栏实施例11, 第13栏第30-55行, 第14栏第15, 30-45行	1-17	X	LINDA G. Lee等. "Thiazole Orange: A New Dye for Reticulocyte Analysis" cytometry, 第7卷, 第6期, 1986年11月1日 (1986 - 11 - 01), 第508-517页	1-17	X	THOMAS L. Netzel等. "Base-Content dependence of emission enhancements, quantum yields, and lifetimes for cyanine dyes bound to double-strand dna: photophysical properties of monomeric and bichromophoric dna stains" J. Phys. Chem., 第99卷, 第51期, 1995年11月15日 (1995 - 11 - 15), 第17936-17947页	1-17
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 1226928 A (米凯尔 库比斯塔) 1999年8月25日 (1999 - 08 - 25) B0-1-0/B0-10-0, 说明书第7, 14-16, 22页, 附图14	1-17																		
X	CN 102112875 A (希森美康株式会社) 2011年6月29日 (2011 - 06 - 29) 说明书第5页化合物10, 说明书第27-48段, 权利要求1	1-17																		
X	US 5658751 A (MOLECULAR PROBES INC) 1997年8月19日 (1997 - 08 - 19) 说明书第53栏实施例11, 第13栏第30-55行, 第14栏第15, 30-45行	1-17																		
X	LINDA G. Lee等. "Thiazole Orange: A New Dye for Reticulocyte Analysis" cytometry, 第7卷, 第6期, 1986年11月1日 (1986 - 11 - 01), 第508-517页	1-17																		
X	THOMAS L. Netzel等. "Base-Content dependence of emission enhancements, quantum yields, and lifetimes for cyanine dyes bound to double-strand dna: photophysical properties of monomeric and bichromophoric dna stains" J. Phys. Chem., 第99卷, 第51期, 1995年11月15日 (1995 - 11 - 15), 第17936-17947页	1-17																		
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
<table border="0"> <tr> <td> * 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 </td> <td> "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件 </td> </tr> </table>			* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																			
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期																		
2022年1月4日		2022年2月8日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员																		
中国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10) 62019451		赵鹏 电话号码 010-62084369																		

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	Tarita Biver等. "Influence of cyanine dye structure on self-aggregation and interaction with nucleic acids: A kinetic approach to T0 and B0 binding" Archives of Biochemistry and Biophysics, 第465卷，第1期，2007年5月15日 (2007 - 05 - 15)， 第90-100页	1-17

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/130477

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1226928	A	1999年8月25日	WO	9745539	A1	1997年12月4日
				US	6329144	B1	2001年12月11日
				CA	2256545	A1	1997年12月4日
				CA	2256545	C	2006年10月31日
				CN	100398648	C	2008年7月2日
				SE	9602183	D0	1996年5月31日
				SE	9602183	L	1997年12月1日
				SE	506700	C2	1998年2月2日
				NZ	333473	A	1999年10月28日
				EP	0918852	A1	1999年6月2日
				JP	2005047901	A	2005年2月24日
				RU	2223966	C2	2004年2月20日
				PL	188875	B1	2005年5月31日
				AU	3112997	A	1998年1月5日
				JP	2000511057	A	2000年8月29日
				EP	1357185	A1	2003年10月29日
				BR	9709495	A	1999年8月10日
CN	102112875	A	2011年6月29日	US	2011124005	A1	2011年5月26日
				JP	W02010013678	A1	2012年1月12日
				WO	2010013678	A1	2010年2月4日
				KR	20110049830	A	2011年5月12日
				EP	2320230	A1	2011年5月11日
				AU	2009277638	A1	2010年2月4日
US	5658751	A	1997年8月19日	CA	2179284	A1	1996年5月9日
				CA	2179284	C	2006年4月4日
				AU	1999039672	A1	2000年1月20日
				EP	0740689	A1	1996年11月6日
				EP	0740689	B1	2002年1月30日
				US	5863753	A	1999年1月26日
				DE	69525239	D1	2002年3月14日
				DE	69525239	T2	2002年6月27日
				JP	2009280820	A	2009年12月3日
				JP	4634514	B2	2011年2月23日
				WO	9613552	A2	1996年5月9日
				WO	9613552	A3	1996年7月11日
				JP	2007291403	A	2007年11月8日
				JP	4503047	B2	2010年7月14日
				AT	212653	T	2002年2月15日
				AU	3967295	A	1996年5月23日
				AU	714890	B2	2000年1月13日
				JP	H09507879	A	1997年8月12日